

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT
ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

par

Ahmed BEN ABDELKADER

pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences

BIOGÉNÈSE DES LIPIDES MEMBRANAIRES
PENDANT LA " SURVIE " DE TRANCHES
DE TUBERCULES DE POMME DE TERRE
(*Solanum tuberosum* L.)

Soutenue le 21 Décembre 1972 devant la Commission d'Examen composée de :

MM les Professeurs

R. ULRICH

Président

G. DUCET
P. MAZLIAK
C. LIORET

}
Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547102_0029

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT
ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

par

Ahmed BEN ABDELKADER

pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences

BIOGÉNÈSE DES LIPIDES MEMBRANAIRES
PENDANT LA " SURVIE " DE TRANCHES
DE TUBERCULES DE POMME DE TERRE
(*Solanum tuberosum L.*)

Soutenue le Décembre 1972 devant la Commission d'Examen composée de :

MM les Professeurs

R. ULRICH Président

G. DUCET
P. MAZLIAK
C. LIORET

} Examineurs

THÈSE

DE DOCTORAT DE LA
EN SCIENCES NATURELLES

présentée

À L'UNIVERSITÉ PARIS VI

par

Abdoul BEN ABDELKADIR

pour obtenir le grade de Docteur en Sciences

BIOSYNTHÈSE DES LIPIDES MEMBRANAIRES
PENDANT LA "MUE" DE TENCHES
DE TUBERCULES DE POMME DE TERRE



Leiden, le 15 Mars 1982

par les Professeurs

A. GELCH

A. HOUT

A. J. VAN DER

C. LAMET

A LA MEMOIRE
DE
DAVID POWELL HACKETT

A CATHERINE

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	8
<u>HISTORIQUE</u> - LA SURVIE	11
A - STIMULATION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE	12
B - EXALTATION DE LA SYNTHESE DES PROTEINES	19
C - EXALTATION DES SYNTHESES LIPIDIQUES	21
D - ABSORPTION ACTIVE D'IONS	21
E - INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE	22
<u>I - METHODES EXPERIMENTALES</u>	24
A - MATERIEL VEGETAL	24
B - CONDITIONS EXPERIMENTALES DE LA SURVIE	24
C - OBTENTION DES FRACTIONS CELLULAIRES	27
D - CONTROLES BACTERIOLOGIQUES	30
E - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	32
F - EXAMEN DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ASSOCIEES AUX FRACTIONS CELLULAIRES .	32
G - PRECURSEURS RADIOACTIFS	34
H - EXTRACTION DES LIPIDES	36
I - ANALYSE DES LIPIDES BRUTS	38
J - ANALYSE DES ACIDES GRAS	42
K - DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES	43
L - DOSAGE DES PROTEINES	45
M - EXPRESSION DES RESULTATS	45
<u>II - REMANIEMENTS CYTOLOGIQUES AU COURS DE LA SURVIE</u>	47
A - OBSERVATIONS PRELIMINAIRES	47
1) Aspect macroscopique	47
2) Examens en microscopie optique	47
B - EXAMENS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	49
1) Populations ribosomales	49
2) Réticulum endoplasmique	52
3) Appareil de Golgi	54
4) Populations plastidiales	55
5) Mitochondries	57

6) Peroxysomes	59
7) Membrane cytoplasmique	59
C - CONCLUSIONS GENERALES DES RECHERCHES CYTOLOGIQUES	60
III - <u>MODIFICATIONS TOUCHANT LES PROTEINES ET LES LIPIDES MEMBRANAIRES AU</u> <u>COURS DE LA SURVIE</u>	62
A - CARACTERISTIQUES DES FRACTIONS CELLULAIRES ISOLEES	62
1) Observations morphologiques	62
2) Activités physiologiques	66
a) Activité respiratoire et couplage énergétique des mitochondries ..	67
b) Activités enzymatiques associées aux fractions cellulaires	70
B - PROTEINES DES FRACTIONS CELLULAIRES	74
1) Teneur en protéines	74
2) Stimulation des capacités de biosynthèse	75
C - LIPIDES DES FRACTIONS CELLULAIRES	77
1) Teneur en lipides du tubercule de Pomme de terre	77
2) Classes de lipides	78
3) Catégories moléculaires de phospholipides	79
4) Composition en acides gras totaux	81
5) Acides gras des catégories lipidiques	83
D - CONCLUSIONS	85
IV - <u>BIOSYNTHESE DES LIPIDES MEMBRANAIRES</u>	88
A - ETUDE IN VIVO	88
1) Intensité des synthèses lipidiques au cours de la survie	89
2) Nature des lipides synthétisés	92
3) Biosynthèse des acides gras	94
a) Intensité des biosynthèses	94
b) Nature des acides gras synthétisés	95
c) Facteurs influençant la biosynthèse de l'acide linoléique	96
d) Cinétiques de formation pendant la survie	97
4) Distribution dans les diverses catégories moléculaires	100
B - ETUDE IN VITRO	105
1) Biosynthèse des lipides dans les mitochondries isolées	105
a) Biosynthèse des acides gras	105
b) Nature des acides gras synthétisés par les mitochondries isolées .	108
c) Nature des phospholipides où s'insèrent les acides gras synthétisés.	109

2) Biosynthèse des lipides dans les microsomes	111
a) Cinétiques d'incorporation des précurseurs radioactifs	111
b) Nature des acides gras synthétisés	113
3) Etude de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase au cours de la survie	114
a) Protocole expérimental	114
b) Résultats	115
b ₁ - Propriétés enzymatiques	115
b ₂ - Localisation intracellulaire	118
b ₃ - Induction au cours de la survie	119
c) Discussions	120

C - CONCLUSIONS GENERALES SUR LA BIOSYNTHESE DES LIPIDES AU COURS DE LA SURVIE	121
---	-----

V - <u>ECHANGES DE LIPIDES ENTRE FRACTIONS CELLULAIRES</u>	123
--	-----

A - ECHANGES DE LIPIDES IN VITRO ENTRE FRACTIONS CELLULAIRES ISOLEES DE TISSU FRAICHEMENT PRELEVE	124
1) Echanges de phospholipides	124
2) Echanges d'acides gras	131

B - ECHANGES DE LIPIDES IN VITRO ENTRE FRACTIONS CELLULAIRES ISOLEES DE TISSU FRAIS ET DE TISSU EN SURVIE	133
1) Mélanges expérimentaux	134
2) Résultats	136
a) Echanges globaux de phospholipides	136
b) Echanges globaux d'acides gras	138
c) Nature des acides gras échangés	139
3) Conclusions	140

C - ECHANGES DE LIPIDES IN VIVO	141
1) Incorporation de précurseurs radioactifs in vivo	141
2) Expériences de "chasse" de la radioactivité incorporée	142
a) Long temps de marquage initial	142
b) Bref temps de marquage initial	142

D - CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS GENERALES SUR LES ECHANGES INTRACELLULAIRES DE LIPIDES	147
1) Mécanismes proposés pour expliquer ces échanges	147
2) Importance physiologique des échanges de lipides	150

VI - <u>REGULATION GENETIQUE DE LA SURVIE</u>	153
A - EFFET DES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE RIBOSOMALE (cycloheximide, puromycine, chloramphénicol)	153
1) Modifications ultrastructurales - effet de la cycloheximide	153
2) Variations de la teneur en protéines	154
3) Incorporation de la (³ H)-leucine dans les protéines	156
4) Action des inhibiteurs sur la stimulation de l'activité de la NADH-cytochrome c-réductase	157
5) Action des inhibiteurs de la synthèse des protéines sur la stimulation des synthèses lipidiques	157
6) Effet des inhibiteurs de la synthèse des protéines sur la nature des lipides synthétisés	159
7) Effet des inhibiteurs de la synthèse des protéines sur l'induction de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase	161
B - EFFETS DES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLEIQUES	161
1) Modifications ultrastructurales	161
2) Action de l'actinomycine D sur les synthèses lipidiques	162
C - DISCUSSIONS	163
VII - <u>SURVIE ET CROISSANCE</u>	168
A - CYTOLOGIE COMPAREE	171
1) Population ribosomale	171
2) Membranes du réticulum endoplasmique	172
3) Dictyosomes	172
4) Mitochondries	173
5) Plastides	173
B - LIPOGENESE COMPAREE	175
1) Intensité des biosynthèses	175
2) Nature des acides gras synthétisés	175
3) Biosynthèse des acides gras dans les tranches de tubercule germé maintenues en survie	176
4) Activité de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase	177
C - CONCLUSIONS	178
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u> - SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DE LA SURVIE	180

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

C ₁₆	=	Acide palmitique
C _{16:1}	=	Acide palmitoléique
C ₁₈	=	Acide stéarique
C _{18:1}	=	Acide oléique
C _{18:2}	=	Acide linoléique
C _{18:3}	=	Acide α -linoléique
C ₂₀	=	Acide arachidique
PC	=	Phosphatidylcholine
PE	=	Phosphatidyléthanolamine
PI	=	Phosphatidylinositol
PG	=	Phosphatidylglycérol
PS	=	Phosphatidylsérine
DPG	=	Diphosphatidylglycérol
AP	=	Acide phosphatidique
Lyso PC	=	Lysophosphatidylcholine
Lyso PE	=	Lysophosphatidyléthanolamine
GPC	=	Glycérophosphorylcholine
GPE	=	Glycérophosphoryléthanolamine
GPI	=	Glycérophosphorylinositol
GPS	=	Glycérophosphorylsérine
GP	=	Glycérophosphate
GPGPG	=	1-3 Diglycérylphosphorylglycérol
GPcyc.	=	Glycérophosphate cyclique
MGDG	=	Monogalactosyldiglycéride
DGDG	=	Digalactosyldiglycéride
ESG	=	Stéryl glucoside estérifié
SG	=	Stéryl glucoside
LN	=	Lipides neutres
ADP	=	Adénosine diphosphate
ATP	=	Adénosine triphosphate
ARN	=	Acide ribonucléique
ADN	=	Acide désoxyribonucléique

CoASH	=	Coenzyme A (réduit)
Pi	=	Orthophosphate
NADPH	=	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NADH	=	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
pmoles	=	picomoles = $\mu\mu$ moles
nmoles	=	nanomoles = m μ moles
nm	=	nanomètre = 1 m μ
EDTA	=	Ethylène - diamine - tétraacétique

INTRODUCTION

L'un des importants thèmes de recherches en Biologie est l'étude de la structure, de la biogénèse et des rôles physiologiques des *membranes cellulaires*. Ces membranes sont des *complexes lipoprotéiques* : l'étude des *lipides membranaires* (composition biochimique, métabolisme) est donc nécessaire pour faire progresser les connaissances dans le domaine des membranes. Un matériel biologique commode pour de telles investigations est le tubercule de Pomme de terre, organe végétal dépourvu de lipides de réserve et où on ne trouve pratiquement que des lipides membranaires. D'autre part, la physiologie générale de ce tubercule est bien connue ; il est possible de relier les événements concernant les lipides membranaires aux autres phénomènes métaboliques survenant au cours de la vie de l'organe.

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes aperçus que des lipides membranaires étaient abondamment synthétisés pendant la *survie* de tranches de Pomme de terre ; la *survie*, connue depuis longtemps sous le terme d'*aging*, est un procédé expérimental qui consiste à garder des tranches minces de tubercule en milieu humide et aéré pendant 24 heures environ ; la *survie* provoque toute une série de bouleversements métaboliques : stimulation de l'intensité respiratoire, synthèse de protéines, absorption d'ions, biosynthèse d'acides gras. Nous avons donc systématiquement étudié la formation de ces lipides membranaires au cours de la *survie*, en nous posant les questions suivantes : où sont synthétisés ces lipides dans les cellules ? A quel moment de la *survie* ? Quand et comment sont-ils intégrés dans les membranes ? Nous nous sommes particulièrement intéressés au métabolisme de l'acide *linoléique*, l'acide gras le plus abondant dans le tubercule de Pomme de terre et dans de nombreux végétaux supérieurs ; lorsque nous avons commencé nos recherches, les voies de biosynthèse de cet acide gras *essentiel* étaient pratiquement inconnues.

Au cours de ces recherches, nous avons eu constamment le souci de situer les événements touchant les lipides des fractions cellulaires par rapport au devenir des autres constituants membranaires, tels les protéines, ou par rapport aux activités physiologiques essentielles des cellules ; d'autre part, nous avons porté notre attention à l'évolution des ultrastructures cellulaires pour essayer de relier les changements biochimiques et métaboliques observés au cours de la *survie* aux modifications cytologiques. Pour mieux comprendre le déclenchement des événements liés à la *survie*, nous avons perturbé le cours normal du processus en utilisant des inhibiteurs de la synthèse protéique. Enfin -préoccupation légitime pour un physiologiste - nous devons rechercher si la reprise générale des activités métaboliques déclenchée par

la *survie* se produisait au cours de la vie normale de la plante ; nous avons donc comparé les bouleversements morphologiques et biochimiques survenant au cours de la *survie* aux évènements observés dans les germes de Pomme de terre démarrant leur croissance.

De cet ensemble de recherches, nous tirons un tableau ordonné des principaux évènements morphologiques et physiologiques survenant dans des cellules placées dans les conditions nouvelles choisies par l'expérimentateur. La comparaison entre les transformations observées dans les tissus en *survie* et celles notées dans les tissus en pleine croissance nous permet de dégager la signification physiologique des phénomènes accompagnant la *survie*.

o

o

o

Ces recherches ont été effectuées au laboratoire de Physiologie Cellulaire de l'Université PARIS VI (équipe de recherches associée au C.N.R.S., n° 323), dirigé par Monsieur le Professeur MAZLIAK.

Une partie importante de ce travail a nécessité l'utilisation de techniques de microscopie électronique ; malgré la tâche ingrate que constituaient parfois pour eux ces analyses, j'ai pu bénéficier de l'aide de plusieurs laboratoires. Le Professeur Anne-Marie CATESSON, Sous-Directeur du laboratoire de Botanique de l'Ecole Normale Supérieure, a réalisé les premiers examens qui étaient essentiels pour la suite de mes expériences. Madame MENTRE, du laboratoire de Biologie Cellulaire d'Ivry, dirigé par Monsieur le Professeur FAVARD, m'a initié à de nouvelles techniques de traitement des fractions cellulaires. Enfin, Monsieur AUDERSET, du laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Genève, dirigé par Monsieur le Professeur GREPPIN, m'a fourni des documents qui confirmaient avec netteté, tout en les amplifiant, les premières observations ; je lui dois la majeure partie des illustrations photographiques ; son enthousiasme pour la recherche a joué un rôle important dans la poursuite de mes investigations. J'adresse mes remerciements chaleureux à tous ces chercheurs qui m'ont permis de jeter un regard neuf sur des phénomènes dont seule l'étude biochimique m'était possible.

Le matériel végétal m'a été fourni par l'Institut Technique de la Pomme de terre, anciennement dirigé par Monsieur MONOT, et dont l'actuel Directeur est Monsieur CROSNIER ; j'associe leurs collaborateurs dans ma gratitude. Messieurs MICHIELS, de l'Institut APPERT, JOLIVET, de l'INRA de Versailles et CÔME, du laboratoire de Biologie Végétale de Meudon, ont fortement contribué à mieux me faire connaître la physiologie du tubercule de Pomme de terre, ce dont je les remercie.

Mes amis du laboratoire m'ont aidé à surmonter les problèmes matériels qui se posent souvent en période de pénurie de moyens ; discuter avec eux a été très utile pour critiquer les résultats ; je remercie donc Alain, Anne-Marie, Annette, Antoine, Chantal, Chérif, Dominique, Françoise, Gilles, Gilbert, Jean-Paul, Michèle, qui m'ont permis de travailler dans la meilleure ambiance possible. Monsieur Alain JOUJOU a toujours trouvé, en plus de son propre travail, le temps de me donner un peu d'aide technique dévouée ; je l'assure de ma reconnaissance. Un moment important dans

ce travail a été la confection des multiples exemplaires indispensables, j'ai trouvé en Madame Micheline POITTEVIN, comme à l'habitude, beaucoup d'efficacité et de soin dans l'exécution des ouvrages ; je la remercie pour son aide et pour sa conscience professionnelle digne d'éloges. Je remercie également Monsieur Robert POITTEVIN, Maître-Assistant à l'Université de PARIS VI, qui, assisté de Madame LAFUENTE, a participé activement à la réalisation technique des copies.

Monsieur le Professeur GUERN m'a souvent prodigué encouragements et conseils et j'ai été sensible à son intérêt sincère pour mon travail.

Le Jury d'examen de ce Mémoire rapproche ceux qui ont joué un rôle important dans ma carrière scientifique.

J'ai trouvé auprès de Monsieur le Professeur ULRICH, aux moments difficiles de mes débuts dans la recherche en France, lorsqu'il m'accueillit dans son laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée de la Sorbonne, les plus vifs encouragements et la plus grande bienveillance. Au fil des années, au cours de nos entretiens, il a toujours fait preuve de la plus amicale sollicitude et d'un constant intérêt pour mon travail. C'est pour moi un grand honneur qu'il ait bien voulu assumer la présidence du Jury.

Monsieur le Professeur DUCET a guidé mes premiers travaux scientifiques lorsqu'il dirigeait la laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de Tunis ; ses encouragements et ses impulsions dynamiques en faveur de la recherche me furent très précieux. J'ai eu la joie de le retrouver en France, travaillant sur des problèmes scientifiques très voisins. Qu'il ait accepté de juger ce travail, après en avoir suivi les progrès, est pour moi une grande fierté.

Monsieur le Professeur LIORET, qui est mon parrain scientifique pour le C.N.R.S., s'est intéressé, année après année, à mes recherches. Il a bien voulu faire partie de ce jury. Qu'il en soit vivement remercié.

C'est grâce à Monsieur le Professeur MAZLIAK que j'ai pu mener à bien le long travail qu'a nécessité le présent Mémoire. Je lui dois toute mon initiation au domaine alors inconnu pour moi, et peu connu en France, du métabolisme des lipides chez les végétaux ; cette initiation s'est faite dans un tel esprit d'amitié que toutes les difficultés se dissipaient devant la découverte de ce monde fascinant. J'ai bénéficié de ses enseignements, de ses explications claires sur de nombreux phénomènes et de son enthousiasme pour la recherche. Après plusieurs années passées auprès de lui dans une lutte constante contre de multiples problèmes, je suis très heureux d'arriver à l'aboutissement de mes efforts en présentant ce Mémoire. Je le lui dédie en sincère Hommage.

HISTORIQUE - LA SURVIE

Les auteurs anglo-saxons désignent par "aging" (ou "ageing") la technique expérimentale consistant à disposer dans un milieu humide et aéré des tranches fines d'organes de réserve pendant 1 à plusieurs jours. Pour traduire l'expression anglo-saxonne, nous avons préféré le terme "*survie*" au mot "vieillissement" qui met l'accent sur la sénescence irréversible des tissus ; le terme anglais "ageing" ne fait qu'évoquer, de façon plus neutre, une certaine durée pendant laquelle le tissu végétal est traité. Le mot *survie* s'accorde mieux, par ailleurs, avec la stimulation générale des activités métaboliques qui accompagne le maintien des tranches de tissu dans les conditions qui seront précisées plus loin.

Les chercheurs se sont rapidement rendu compte de la nécessité de prendre certaines précautions expérimentales pour réaliser les expériences de *survie*. En effet, maintenir pendant un temps assez long (au minimum une journée) des tranches minces (1 à 2 mm d'épaisseur) de tubercules dans des conditions humides et aérées pouvait entraîner des pullulations bactériennes ou une activation des polyphénol-oxydases provoquant un noircissement des tissus. Pour éviter les invasions bactériennes, les chercheurs ont introduit des antibiotiques dans le milieu de *survie* ou ont travaillé dans des conditions stériles. Par ailleurs, les conditions d'humidité élevée limitent les noircissements dus aux polyphénol-oxydases.

Les bouleversements métaboliques importants liés à la *survie*, dont la manifestation la plus spectaculaire est une stimulation de l'intensité respiratoire, sont communs à tous les tissus de réserve maintenus en *survie* et ne se produisent pas dans les tissus en croissance. C'est ainsi que, parmi les organes de réserve, en plus du tubercule de Pomme de terre, que nous étudierons plus loin en détail, on peut citer la Carotte (ROBERTSON et TURNER, 1945) (MAC DONALD et DEKOCK, 1958) (BENNET-CLARK et BEXON, 1943), le tubercule de Topinambour (STILES et DENT, 1947), les racines de Chicorée (LATIES, 1959) ou de Betterave (KOLATTUKUDY et REED, 1966) (MAC DONALD et DEKOCK, 1958) ; par contre, on n'observe pas de crise respiratoire pendant le maintien en *survie* de tranches de Pomme (HACKNEY, 1945), de segments d'épicotyle de Pois (PALMER et LOUGMAN, 1964), de tranches de Melon (APREES, 1966) ; cependant, APREES (1966) a démontré que le maintien en *survie* de disques de pétiole de Céleri, de cotylédons d'Avocat ou de tige de Lierre s'accompagnait d'une stimulation de l'intensité

respiratoire. Malgré ces exceptions, on peut affirmer que la *survie* est bien caractéristique des organes de réserve.

On ne peut pas interpréter les évènements observés au cours de la *survie* comme étant dus à de simples divisions cellulaires ; en effet, aucune division cellulaire ne se produit dans les tranches de tissu pendant les 48 premières heures suivant la coupe (STEWARD et al., 1932). Dans cet Historique, nous nous intéresserons d'ailleurs surtout aux phénomènes qui ont lieu pendant les 24 premières heures de la *survie*.

Nous décrirons en premier lieu la *crise respiratoire* liée à la *survie*, puis successivement les changements touchant les constituants protéiques et lipidiques.

Pour des raisons de commodité, nous évoquerons principalement dans cette mise au point les travaux expérimentaux publiés jusqu'en 1967, date à laquelle nous avons commencé nos recherches, en réservant la présentation des publications reçues par la suite dans les discussions de nos données expérimentales.

A - STIMULATION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE

C'est BOEHM, en 1887, qui observa le premier que lorsqu'un tubercule de Pomme de terre est coupé, il se produit une augmentation importante du rejet de gaz carbonique par le tissu. RICHARDS (en 1896) confirma ces observations et supposa que l'entrée plus facile de l'oxygène dans les tissus était responsable de cet accroissement du rejet de gaz carbonique. Il eut l'idée de réunir les deux parties coupées du tubercule : dans ces conditions, la crise respiratoire n'est pas observée.

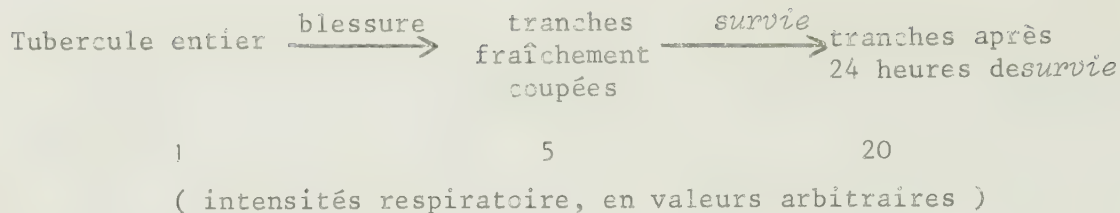
Il a fallu attendre de nombreuses années pour que des recherches systématiques soient effectuées sur des tranches de tubercules par l'équipe de STEWARD (1930) (1932) (STEWARD et al., 1932). Ces travaux ont permis de dégager les principaux évènements touchant à la fois la respiration et l'absorption de sels minéraux ; leurs expériences - qui ont servi de modèle aux recherches ultérieures - consistaient à agiter des tranches minces de tubercules dans de l'eau désionisée pendant 24 à 136 heures ; la vitesse de rejet de gaz carbonique exprimée en milligramme de gaz par gramme de matière fraîche, augmente pendant le premier jour d'expérience, et reste

à cette valeur élevée 2 à 3 jours durant. STEWARD et al., (1932) ont établi que les conditions d'aérobiose ou l'épaisseur des disques (variant de 0,75 mm à 2 mm) influent sur le développement de la respiration dans les tranches de tissu : la respiration exprimée par rapport au poids du tissu décroît quand l'épaisseur augmente. Accompagnant cette exaltation de la respiration, une capacité accrue d'absorption de sels minéraux se développe.

De nombreuses hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer cette stimulation de l'intensité respiratoire, qui se produit pendant le traitement des tranches de tissu. A travers ces différentes hypothèses, nous allons découvrir les caractéristiques propres de la *survie*.

1) La crise respiratoire serait la conséquence d'une blessure

Un traumatisme initial est obligatoirement lié à la manifestation de la crise respiratoire. La blessure des tissus peut libérer des gaz, du gaz carbonique par exemple, présents dans les méats intercellulaires, et provoquer ainsi une exaltation apparente de la respiration (exprimée en quantité de gaz carbonique libéré) : il est établi que les blessures provoquent dans les tissus végétaux (dans les fruits, par exemple) une crise respiratoire (ULRICH, 1936) (BLOCH, 1941). STEWARD et al. (1932) et BENNET-CLARK et BEXON (1943) ont donc supposé que la blessure elle-même induisait la crise respiratoire. D'autres arguments sont trouvés dans les stimulations de la respiration dans des tubercules de Pomme de terre traumatisés à la suite de l'épluchage, la fragmentation en gros quartiers, l'irradiation (RICHARDS, 1896) (JOHNSTONE, 1925) (HOPKINS, 1927) (MICHIELS, 1967) (BLOCH, 1941). Cependant il convient de faire une distinction entre deux phénomènes bien différents (LATIES, 1962) : le premier de ces phénomènes est l'augmentation de l'intensité respiratoire qui suit *immédiatement* l'excision des tranches de tissu, augmentation égale à 5 fois l'intensité initiale quand elle est exprimée en volume d'oxygène consommé par unité de temps et pour une même masse de tissu frais ; un deuxième phénomène est la multiplication par 3 ou 4 de cette nouvelle intensité respiratoire, multiplication qui se produit pendant les 24 premières heures de la *survie*. Dans le premier cas, il s'agit d'une crise respiratoire de blessure provoquée aussi par l'augmentation des surfaces d'échanges ; le deuxième phénomène est désigné par LATIES (1962) sous le terme de respiration *induite* ou *développée*. Le schéma suivant résume l'enchaînement des faits :



Un argument contre l'importance accordée à l'effet de blessure est l'indépendance du développement de la crise respiratoire par rapport à l'épaisseur des tranches de tissu, au moins pendant les 8 premières heures de la *survie* (l'intensité respiratoire étant exprimée par rapport au gramme de poids frais) (LATIES, 1962) ; si les surfaces d'échange jouaient un rôle essentiel, des disques de 3 ou de 0,5 mm d'épaisseur devraient se comporter différemment.

On peut aussi rejeter l'hypothèse que cette crise respiratoire est liée à la formation d'un périderme de blessure ; en effet, la formation d'un tel périderme nécessite plusieurs jours et ne se manifeste pas dans les tranches maintenues en milieu liquide (STEWART et al., 1932).

En résumé, si le stimulus initial provoquant la *survie* est bien un traumatisme subi par l'organe entier, le développement des événements ultérieurs n'est pas une simple conséquence de ce traumatisme.

2) La crise respiratoire serait la conséquence d'une entrée plus facile de l'oxygène.

L'excision de tranches minces d'organes de réserve augmentant considérablement les surfaces d'échange, on a supposé assez tôt que l'entrée plus facile de l'oxygène était le facteur essentiel provoquant la stimulation de l'intensité respiratoire . STEWARD et al. (1932) ont effectivement montré que le rejet de gaz carbonique par les tranches de tissu, exprimé par rapport à l'unité de poids de matière fraîche, diminuait à mesure que l'épaisseur augmentait. Ils ont donc supposé que les couches cellulaires les plus proches de la surface ont une activité métabolique plus élevée que les couches cellulaires profondes en raison de la plus grande abondance

d'oxygène superficiellement. C'est ce qui expliquerait la faible respiration des tubercules entiers, respiration exprimée en rejet de gaz carbonique (STICH, 1891) ou en absorption d'oxygène (CHEVILLARD et al., 1930). STILES et DENT (1947) ont imaginé une hypothèse semblable.

L'hypothèse de l'entrée plus facile de l'oxygène s'est trouvée opposée à plusieurs faits. Ainsi, LATIES (1962) a augmenté la concentration en oxygène dans l'atmosphère où sont étudiées les tranches de tissu ; il n'observe pas d'augmentation de l'intensité respiratoire des tranches fraîchement prélevées. Dans ces tranches, une variation d'épaisseur de 0,5 à 2 mm ne provoque pratiquement aucun effet sur l'intensité respiratoire. D'autre part, des travaux de DEVAUX (1891) et de BURTON (1950) ont pu démontrer qu'à l'intérieur du tubercule entier l'oxygène serait de 0,15 atmosphères ; la concentration de ce gaz serait de 50 à 75 % de celle de l'air. Il en résulte que l'oxygène ne semble pas être un facteur limitant de la respiration dans l'organe entier ; l'oxygène est plutôt un facteur nécessaire au développement de la stimulation respiratoire pendant la *survie*.

C'est ainsi que l'épaisseur intervient dans le *développement* de la crise respiratoire liée à la *survie* ; l'intensité respiratoire est inversement proportionnelle à l'épaisseur des disques (entre 0,5 et 3 mm). MAC DONALD (1967) et LATIES (1967b) ont confirmé ces observations. Une atmosphère enrichie en oxygène ne supprime pas cette relation.

3) La crise respiratoire serait due à l'élimination d'un inhibiteur volatil

LATIES (1962) (1967a) a tenté d'expliquer la relation entre l'épaisseur des disques et le développement de la crise respiratoire en imaginant une élimination d'un inhibiteur volatil, lors de l'excision, inhibiteur qui diminuerait la respiration dans le tubercule entier. L'élimination de ce facteur hypothétique serait ralentie dans les tranches les plus épaisses. Cet inhibiteur pourrait être l'acétaldéhyde d'après LATIES (1962), mais aucune preuve définitive n'a été apportée.

4) La crise respiratoire serait due à une concentration élevée de substrat

Pendant la *survie*, on peut observer une disparition de l'amidon

- 1 -

dans les tranches de tissu ; cette observation de PRIESTLEY et WOFFENDEN (1923) a été confirmée par STEWARD et al. (1932) qui ont localisé ce phénomène dans les couches cellulaires proches de la surface. Parallèlement, une augmentation de la concentration en sucres solubles se produit. Il était tentant de relier cette abondance de sucres facilement métabolisables à la crise respiratoire (HOPKINS, 1927), mais aucune corrélation nette n'a pu être établie entre ces deux événements (STEWARD et al. 1932). Cependant, il convient de rappeler que, pendant la conservation du tubercule intact, on observe une augmentation de la concentration en sucres solubles, accompagnant la phase de croissance rapide des germes (BURTON, 1965 ; MICHIELS, 1967).

Si aucune des hypothèses que nous venons de commenter n'explique d'une façon nette le phénomène de l'exaltation respiratoire, elles ont eu l'avantage de stimuler les recherches et d'apprendre des faits nouveaux concernant la *survie*. De nouveaux mystères ont surgi quand les chercheurs se sont intéressés à l'aspect qualitatif de la respiration induite.

Les nombreux travaux de HACKETT et de ses collaborateurs ont montré que des changements métaboliques profonds accompagnaient l'apparition de la respiration induite . Cette nouvelle respiration diffère fondamentalement de la respiration initiale présente dans les tranches fraîches *par son insensibilité au cyanure de sodium, à l'oxyde de carbone ou au dinitrophénol* (HACKETT, 1956 ; HACKETT et HAAS, 1958 ; HACKETT et al., 1960).

ROMBERGER et NORTON (1961) puis LATIES et HOELLE (1965), LEE et CHASSON (1966a) ont montré que la respiration se développant au cours de la *survie* était sensible au malonate, contrastant avec la respiration des tranches fraîches qui est résistante à ce produit.

C'est à propos de ces découvertes que des nouvelles hypothèses vont être émises (*Tableau I*).

La sensibilité au malonate es tranches en *survie* peut s'expliquer par l'existence d'un *cycle de Krebs fonctionnel dans ces tissus*, alors que, dans les tranches fraîches, ce cycle serait bloqué. LATIES (1964) a confirmé cette hypothèse en étudiant l'oxydation des substrats du cycle des acides tricarboxyliques par les tranches en *survie* . APREES et BEEVERS (1960) ont suggéré que le cycle des pentoses-phosphates intervenait dans la respiration induite ; LATIES (1964) a en outre trouvé que dans les disques fraîchement coupés, le cycle est bloqué au niveau de l'isocitrate-déshydrogénase

TABLEAU I

Comparaison des caractéristiques de la respiration des tranches fraîches ou en survie prélevées dans le tubercule de Pomme de terre.

TRANCHES FRAÎCHES	TRANCHES EN SURVIE
Résistante au malonate	Sensible au malonate (ROMBERGER et NORTON, 1956 ; LATIES, 1962 ; LEE et CHASSON, 1966a)
Sensible au cyanure de sodium à l'oxyde de carbone à l'antimycine A	Résistante au cyanure de sodium à l'oxyde de carbone à l'antimycine A (HACKETT, 1956)
Cycle de Krebs bloqué (au niveau de l'isocitrate deshydrogénase ?) Respiration de base : oxydation des acides gras ?	Cycle de Krebs fonctionnel (LATIES, 1964) Mécanisme compensateur ? (LATIES et HOELLE, 1965)

(LATIES, 1967a) ; la respiration de base serait alors due à une alpha-oxydation des acides gras à longue chaîne (LATIES et HOELLE, 1967) ; ce dernier point n'a jamais été démontré clairement. Signalons à propos de l'effet du malonate que la technique de maintien en *survie* semble avoir une certaine importance : la respiration qui se développe dans les tranches agitées en milieu liquide serait effectivement sensible au malonate, alors que la respiration qui est induite dans les tranches maintenues en atmosphère aérobie serait en majeure partie résistante au même inhibiteur (LEE et CHASSON, 1966a). [(LANGE (1970), associera ce phénomène à la formation lente (2 ou 3 jours) d'une couche de subérine dans le deuxième cas)].

La résistance au cyanure, par contre, est plus difficilement explicable. Une telle respiration peut être trouvée naturellement pendant le développement de Spadices d'Arum (JAMES et BEEVERS, 1950) ; on retrouve ce phénomène dans les tranches de Betterave en *survie* (KOLATTUKUDY et REED, 1966). LATIES et HOELLE (1965) ont considéré les deux hypothèses possibles. La première est d'imaginer que l'effet inhibiteur normal du cyanure ne s'exerce pas dans les tranches en *survie* ; ils rejettent cette hypothèse en montrant que le cyanure diminue le rejet du $^{14}\text{CO}_2$ et l'absorption du glucose marqué bien que la respiration totale ne soit pas inhibée. Ils considèrent alors une deuxième hypothèse supposant l'existence d'un *mécanisme compensateur*. Nous verrons dans la suite de ce Mémoire que des travaux récents (JACOBSON et al., 1970) font intervenir des constituants lipidiques dans cette respiration compensatrice.

Les aspects qualitatifs et quantitatifs de cette crise respiratoire induite ont été d'abord étudiés sur le tissu entier, mais les chercheurs ont rapidement senti le besoin d'étudier les mitochondries isolées dont le rôle essentiel dans le métabolisme énergétique de la cellule est bien connu. Une des premières hypothèses émises fut d'imaginer que l'augmentation de l'intensité respiratoire était le résultat d'une augmentation du nombre de mitochondries par cellule ou bien, à nombre égal de mitochondries dans une cellule donnée, de supposer une plus grande activité métabolique de chaque mitochondrie.

Effectivement, en 1960, HACKETT et al. (1960) ont noté une augmentation des protéines mitochondriales de 50 à 100% après 24 heures de *survie*. VERLEUR et URITANI (1965) ont trouvé que les culots mitochondriaux isolés de tissu après 24 heures de *survie* contenaient 44% d'azote protéique

en plus que les culots mitochondriaux isolés de tissu frais ; l'activité cytochrome oxydasique totale augmente d'environ 75%. En étudiant les tranches de racines de patate douce (*Ipomea batatas*), ASAHI et al. (1966) notent qu'après 24 heures de *survie*, le taux de protéines acidosolubles et la quantité de lipides augmentent dans la fraction mitochondriale. Les auteurs ont tenté de déterminer le nombre de particules mitochondriales réagissant au Vert Janus en les examinant au microscope optique et, malgré les difficultés que présente le manque de spécificité du colorant et la petite taille des objets observés, les auteurs annoncent un accroissement de 100% du nombre des mitochondries dans les culots. LEE et CHASSON (1966b), comparant les culots mitochondriaux isolés de tranches fraîches et des tranches en *survie*, concluent à une augmentation du même ordre (100%) de l'intensité respiratoire et de la teneur en protéines. Enfin VAN STEVENINCK et JACKMAN (1967), en examinant des disques de Betterave après plusieurs jours de *survie*, trouvent des images suggérant des divisions de mitochondries, images analogues à celles que LEE et CHASSON (1966b) signalent dans les tranches de tubercule de Pomme de terre.

Les difficultés expérimentales de cet ensemble de travaux sont évidentes ; l'une des difficultés majeures est d'obtenir des fractions purifiées sans contamination par d'autres fractions cellulaires (par des microsomes par exemple), puisque les chercheurs n'ont pas fait appel aux techniques de purification sur gradient de saccharose. Néanmoins, on peut retenir de ces travaux les premières indications précieuses sur les modifications provoquées par la *survie* à l'échelle intracellulaire.

Les premières recherches conduites au niveau des fractions mitochondriales isolées, pour tenter d'expliquer les changements des voies terminales d'oxydation des substrats, ont été l'oeuvre de HACKETT et de ses collaborateurs (1960). D'après ces auteurs, bien que la respiration du tissu entier augmente pendant la *survie*, l'oxydation des acides organiques par les culots mitochondriaux n'augmente pas. Il y a même une diminution de l'activité de la cytochrome-oxydase et de la succinate cytochrome réductase, exprimée par rapport à une même quantité de protéines mitochondriales ; par contre les mitochondries isolées de tissu en *survie* possèdent des capacités plus élevées de phosphorylation oxydative (les rapports P/O augmentent), ainsi qu'une activité NADH cytochrome c-réductasique plus intense. Enfin, les proportions respectives des quantités de cytochromes mitochondriaux sont modifiées par la *survie* : le rapport cytochrome b + c /

cytochrome $a + a_3$ augmente après *survie*. HACKETT et ses collaborateurs (1960) supposent qu'un découplage progressif de la respiration se produit dans les mitochondries, mais ce phénomène ne suffit pas à expliquer l'augmentation de la consommation d'oxygène ; d'autre part, l'accroissement du taux des protéines mitochondriales est loin d'expliquer les exaltations de certaines activités enzymatiques comme la NADH cytochrome c-réductase, sensible à l'antimycine A.

HACKETT et al. (1960) retrouvent dans les mitochondries isolées la résistance progressive de la chaîne respiratoire au cyanure : l'oxydation du succinate par les mitochondries isolées de tissu frais est inhibée à 77% par le cyanure de sodium ($2,2 \cdot 10^{-4} M$) alors que l'inhibition n'est que de 11% dans les mitochondries isolées de tranches après *survie*.

Selon VERLEUR et URITANI (1965), la valeur du contrôle respiratoire (rapport de l'intensité respiratoire au stade 3 de CHANCE et WILLIAMS (1955) en présence de substrat et d'ADP, à l'intensité respiratoire au stade 4 (en présence de substrat uniquement après phosphorylation de tout l'ADP), diminue après 24 heures de *survie*, de même que le rapport ADP/O qui baisse de 1.7 à 1.2 (avec le succinate comme substrat)). Par contre ASAHI et al. (1966) trouvent dans les mitochondries de patate douce isolées de tranches après 24 heures de *survie* une élévation de l'activité cytochrome oxydasique et succinate deshydrogénasique.

B - EXALTATION DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES.

=====

Les travaux de CLICK et HACKETT, en 1963, ont permis de considérer les phénomènes accompagnant la *survie* sous un jour nouveau. En effet, ces auteurs ont montré une incorporation importante du précurseur ^{14}C -uracile dans les acides nucléiques et de la ^{14}C -leucine dans les protéines des tissus après 24 heures de *survie*. Cette synthèse élevée des protéines et d'acides nucléiques est nécessaire au développement de la respiration induite : l'addition dans le milieu de *survie* d'inhibiteurs de la synthèse des protéines, comme la puromycine, supprime la stimulation de l'activité respiratoire. Ces capacités élevées de biosynthèse protéique se reflètent par une augmentation de la teneur en protéines des culots mitochondriaux (déjà évoquée) et des culots microsomaux. THIMAN et LOOS (1957) ont par ailleurs noté une augmentation de la quantité totale de protéines dans les tissus

entiers de tubercule de Pomme de terre.

On peut rapprocher de ces résultats la stimulation de systèmes enzymatiques. De nombreuses activités enzymatiques sont fortement augmentées pendant la *survie* ; en plus de la NADH cytochrome c -réductase et de la cytochrome-oxydase, on peut citer la phénol-oxydase (BABA,1958), la catalase (BABA,1958) ; l'invertase augmente fortement (EDELMAN et HALL,1965).

LATIES (1965), puis WILLEMOT et STUMPF (1967b) confirment les résultats de CLICK et HACKETT (1963) en montrant cette synthèse active de protéines et d'acides nucléiques, synthèse inhibée par la cycloheximide ou par l'actinomycine D.

A la lumière de ces résultats, on peut imaginer que la coupe des tranches de tubercules déclenche, par un mécanisme inconnu, la synthèse d'acides nucléiques (et probablement d'ARN messager) dirigeant ensuite la synthèse de protéines (protéines structurales et enzymatiques).

Dans d'autres tissus que le tubercule de Pomme de terre, de semblables effets du maintien en *survie* sur la synthèse de protéines et d'acides nucléiques sont observés : tissu de Betterave (MAC DONALD et al.,1966), (VAUGHAN et MAC DONALD,1967), tissu de Carotte (LEAVER et KEY,1967), tubercule de Topinambour (EDELMAN et HALL,1965). Cette synthèse protéique a été étudiée au niveau des fractions cellulaires de Betterave (ELLIS et MAC DONALD,1967) ; les microsomes isolés de tissus en *survie* ont une capacité élevée de synthèse protéique et ont une teneur en ARN et en protéines plus élevées (50 et 60 % respectivement) ; l'incorporation de leucine marquée dans les protéines et dans l'ARN des microsomes isolés de ces tissus est plus élevée (4 à 6 fois plus forte) après la *survie* des tissus. Cette incorporation *in vitro* est inhibée par la puromycine ou par la cycloheximide. Une série analogue d'expériences a été conduite par CHAPMAN et EDELMAN (1967) qui ont déterminé les capacités de synthèse protéique *in vitro* des fractions cellulaires de Pomme de terre ; les synthèses sont plus élevées après *survie* (3 à 60 fois plus importantes).

D'autre part,dans le tissu de Carotte maintenu en *survie* LEAVER et KEY (1967) ont montré une augmentation de la proportion de polyribosomes pendant les premières heures de *survie* .L'actinomycine D inhibe ce phénomène.

C - EXALTATION DES SYNTHÈSES LIPIDIQUES

Les seules recherches concernant l'étude des lipides et des variations de leur métabolisme ont été effectuées par WILLEMOT et STUMPF (1967a)(1967b). Ces auteurs ont montré que l'incorporation de l'acétate dans les lipides totaux est fortement stimulée pendant la *survie* des tranches de tubercules. Ce changement quantitatif s'accompagne de modifications importantes des biosynthèses : une synthèse d'acide *linoléique*, qui est nulle dans le tissu fraîchement coupé, s'observe pendant la *survie*. Cette synthèse de lipides est inhibée par l'adjonction, dans le milieu, d'inhibiteurs de la synthèse protéique, comme la cycloheximide. Ce résultat, sur lequel nous reviendrons au cours de ce Mémoire, montre qu'une synthèse de protéines nouvelles semble impliquée dans le développement des synthèses lipidiques.

D - ABSORPTION ACTIVE D'IONS

L'absorption des ions, étudiée d'abord par STEWARD et al. (1932) (1943), STEWARD et PRESTON (1940), est considérablement augmentée après *survie* des tranches de tubercules ; l'absorption du phosphore est augmentée de près de 1000 fois, après *survie* des tranches de tissu pendant 24 heures, quand de faibles concentrations de phosphate (10^{-6} M) sont utilisées (LOUGHMAN, 1960). Ce résultat est confirmé par HACKETT et al. (1960) qui précisent que le développement de cette capacité d'absorption du phosphate est inhibé par le maintien des tranches en anaérobiose ou au froid, ou par l'oxyde de carbone (à l'abri de la lumière) ; MAC DONALD et LATIES (1962), BIELESKI et LATIES (1963) ont confirmé ces résultats.

L'absorption des ions chlorure augmente aussi après *survie* et les caractéristiques de cette absorption sont différentes de celles observées dans le tissu frais (SPERLING et LATIES, 1963) (LATIES, 1967b). Un temps de latence pouvant aller jusqu'à 8 heures est observé avant le développement complet des capacités d'absorption des sels, indiquant qu'une certaine préparation du tissu (et probablement une mise en place de divers systèmes actifs) est nécessaire.

Il convient enfin de noter une importante entrée d'eau dans les

disques en *survie* (STEWART et al., 1932), entrée dépendant en partie de l'activité métabolique cellulaire.

E - INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE

L'ensemble des phénomènes observés au cours de la *survie* - entrée d'eau, synthèses importantes de constituants divers - a été comparé par certains auteurs à une reprise de croissance analogue à celle qui se produit au niveau des germes lors du développement normal du tubercule. On sait que certaines substances comme la gibbérelline et les auxines jouent un rôle régulateur dans la croissance des tissus. Des chercheurs ont donc eu l'idée d'étudier l'effet de ces substances sur le déclenchement des phénomènes accompagnant la *survie* (SPERLING et LATIES, 1963).

En fait, la teneur en gibbérellines augmente dans les surfaces coupées du tubercule de Pomme de terre (RAPPAPORT et SACHS, 1967) suggérant une synthèse de cette hormone. L'addition de gibbérelline ou d'acide 3-indolyl-acétique provoque une augmentation de la synthèse de l'invertase dans des disques de tubercule de Topinambour maintenus en *survie* (EDELMAN et HALL, 1965) et une augmentation de la respiration du tissu de tubercule (COUTREZ-GEERINCK, 1970) : un agent activateur, qui serait du type gibbérelline, serait produit pendant les premières heures de la *survie* et se retrouverait dans le milieu extérieur (BRADSHAW et EDELMAN, 1969, disques de Topinambour) ; un inhibiteur de l'action de cette substance serait synthétisé par la suite pendant la *survie* (BRADSHAW et al., 1970).

Après un temps de *survie*, les disques de tubercule de Topinambour présentent une croissance rapide, sans divisions cellulaires, en réponse à l'auxine (ADAMSON, 1962). Cette croissance, liée à l'auxine, dépendrait de la synthèse de protéines nouvelles (MASUDA, 1966 ; NOODEN et THIMANN, 1963).

Ces quelques expériences indiquent que les tranches d'organe maintenues en *survie* sont un bon matériel pour étudier l'effet des régulateurs de croissance.

CONCLUSION

Une stimulation générale touche donc les processus les plus essentiels de la vie de la cellule, au cours de la *survie* de tranches d'organe de réserve : oxydation accrue des substrats respiratoires, synthèse des protéines, synthèse des lipides, absorption d'ions. Il reste cependant de nombreux points à éclaircir, et surtout le manque total de données concernant les remaniements cellulaires gêne beaucoup les interprétations proposées pour expliquer les phénomènes liés à la *survie*. Aucune étude ultrastructurale fine des tranches de tubercule de Pomme de terre en *survie* n'existe ; les seules données ultrastructurales concernent les disques de Betterave (JACKMAN et VAN STEVENINCK, 1967) et indiquent une dégradation initiale des membranes du réticulum endoplasmique, peu compatible avec les synthèses protéiques observées. La *survie* a donc été considérée jusqu'à présent uniquement sous l'angle des bouleversements métaboliques dans les cellules. Serait-il possible que de tels bouleversements se produisent sans modifications des infrastructures cellulaires ?

I - METHODES EXPERIMENTALES

A - MATERIEL VEGETAL

=====

Toutes les expériences ont porté exclusivement sur des tubercules de la variété "*Bintje*" fournis par l'Institut Technique de la Pomme de terre de Paris. Les tubercules (plants certifiés de classe A (Elite)) étaient cultivés dans un champ du Nord Finistère, à Pleyber-Christ (29N) (Agriculteur N°103 de la Coopérative Agricole de Pleyber-Christ). Nous avons ainsi l'assurance que les échantillons utilisés n'avaient pas subi de traitements pouvant influencer sur l'état physiologique (égermage, produits antigerms, traitements chimiques divers) ; d'autre part, les risques d'infections virosées étaient minimes, les infections étant plus fréquentes dans les cultures réalisées en région parisienne. Les tubercules utilisés provenaient la plupart du temps de récoltes normales (plantation en Avril, récolte en Août) et parfois de récoltes dites de "préculture" : plantées en Juillet et récoltées en Novembre.

B- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE LA SURVIE

=====

1) Prélèvement des tranches de tubercule

Dans la partie centrale du tubercule, rincé à l'eau et séché, on prélève à l'aide d'un perce-bouchon un cylindre de tissu de 13 mm de diamètre. Le fragment de tissu est immédiatement plongé dans l'eau désionisée glacée. On prend soin d'éliminer les extrémités du cylindre afin d'éviter les faisceaux vasculaires.

Le cylindre de tissu est ensuite introduit dans le tube métallique horizontal d'un microtome spécialement construit (*Fig.1*) ; l'épaisseur des rondelles est déterminée par le nombre de tours de la manivelle commandant l'axe : 1 mm correspond à 1 tour de manivelle. Les rondelles tombent directement dans de l'eau désionisée glacée ; ces opérations doivent se dérouler très rapidement. Les disques sont ensuite rincés abondamment dans de l'eau désionisée froide (2 litres pour 50 rondelles).

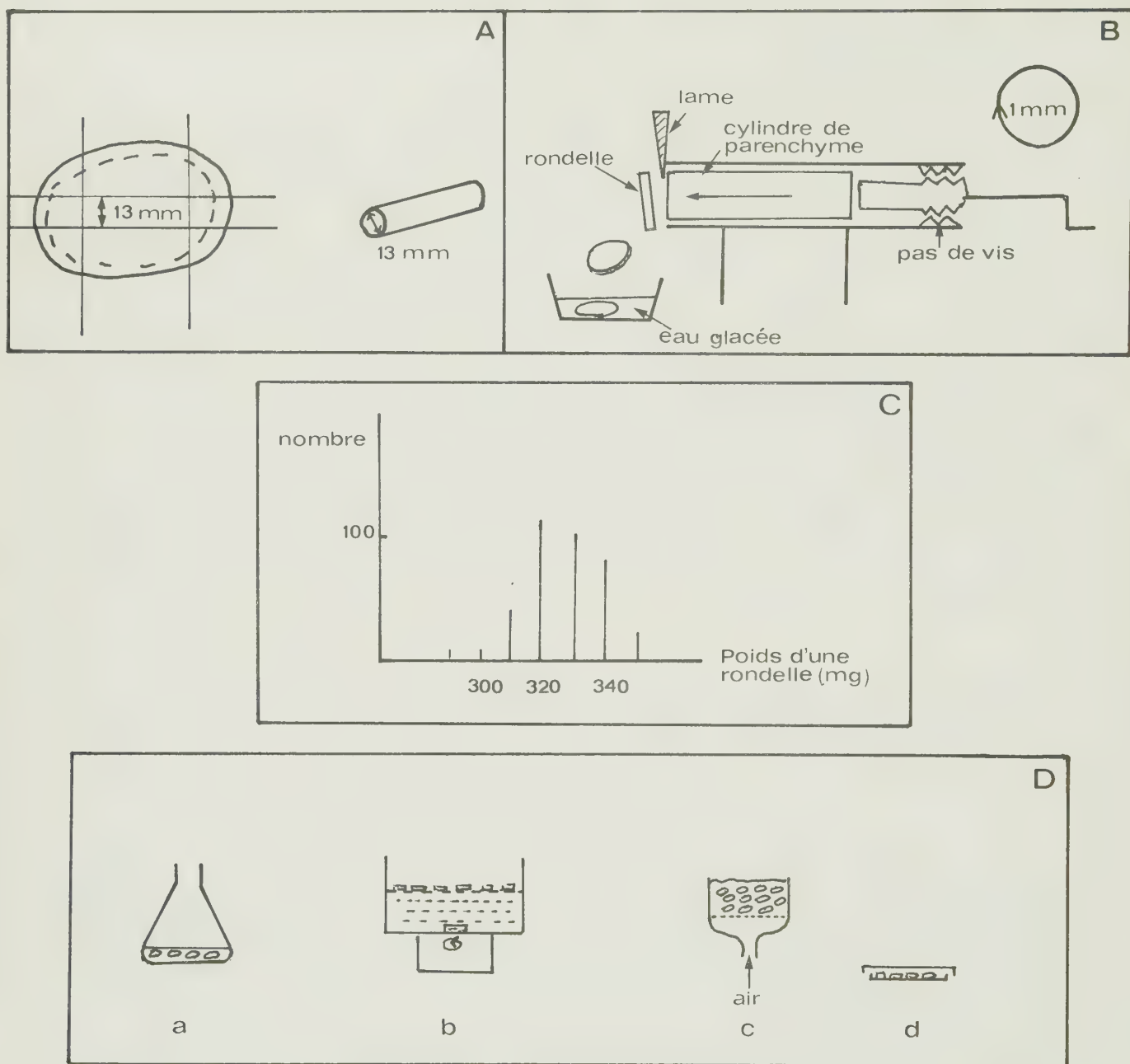


Fig. 1

Techniques de prélèvement des tranches de tubercules et méthodes de maintien en survie.

A- Prélèvement de cylindres de parenchyme dans la partie médullaire.

B- Obtention de tranches à l'aide du microtome spécial.

C- Détermination du poids moyen des tranches.

D- Techniques de maintien en survie :

a- erlenmeyer agité constamment

b- dépôt des rondelles à la surface d'une solution agitée à l'aide d'un barreau magnétique

c- injection d'air comprimé

d- maintien en boîte de Pétri.

Pour diminuer les contaminations bactériennes, les tubercules sont rapidement essuyés à l'alcool à 95° et les instruments utilisés (lames, microtome, perce-bouchon) sont nettoyés à l'alcool. Pour améliorer encore ces conditions, une petite hotte munie d'une lampe germicide à rayons ultraviolets a été construite.

Nous avons travaillé sur des disques de 1 mm ou plus souvent 2 mm d'épaisseur. Ces épaisseurs sont vérifiées au pied-à-coulisse. Les disques obtenus sont pratiquement identiques. La figure montre que leur poids moyen s'établit entre 310 et 330 mg (*l'écart type d'une population de 100 disques est assez faible : 5% de la moyenne*).

2) Conditions du maintien en survie.

Deux facteurs sont nécessaires pour réaliser le maintien en survie dans des conditions satisfaisantes : l'aérobiose et l'humidité élevée. Ces conditions peuvent être satisfaites de différentes façons (*Fig. 1*).

a) Agitation des disques dans une faible quantité de liquide.

Cette technique consiste à introduire les rondelles (50 environ) dans un Erlenmeyer ou une fiole de Fourneau (capacité 500 ml) contenant 20 ml d'une solution de sulfate de calcium (10^{-4} M) et de chloramphénicol (50 µg/ml). L'ensemble est placé dans un bain à température constante (25°C) et agité constamment. Le milieu de survie est changé deux à trois fois en 24 heures. Le sulfate de calcium (10^{-4} M) est ajouté dans le milieu selon les indications de LATIES (1962) ; ce calcium assure le maintien d'une bonne texture tissulaire en intervenant probablement au niveau des composés pectiques des parois cellulodiques : le chloramphénicol, (50 µg/ml) ajouté selon les conseils de LEAVER et EDELMAN (1967) et WILLEMOT et STUMPF (1967a), supprime la prolifération bactérienne qui pourrait se développer. Cependant, dans un grand nombre d'expériences, nous avons éliminé le chloramphénicol du milieu de survie en travaillant dans des conditions d'asepsie strictes : utilisation d'eau distillée stérile, fiole de Fourneau bouchée pendant le maintien en survie. En effet, le

chloramphénicol, comme nous le verrons plus loin, a un effet inhibiteur sur la synthèse protéique mitochondriale ; cette inhibition se manifeste cependant à des concentrations plus élevées que celles utilisées pendant la survie (250 à 500 µg/ml au lieu de 50 µg/ml) ; par contre à cette même concentration, le produit n'a aucun effet sur les synthèses microsomales. Quoiqu'il en soit, nous avons systématiquement vérifié les résultats obtenus avec le chloramphénicol dans le milieu de survie en répétant les expériences sans antibiotique.

b) Rinçage constant des disques placés sur un tamis.

Les disques sont placés sur une cuvette en plastique percée de trous. Cette cuvette est placée dans un cristalliseur en verre (capacité 2000 ml) à la surface d'une solution de sulfate de calcium (10^{-4} M) et de chloramphénicol (50 µg/ml) de façon à ce que les rondelles soient à demi-immergées. Une agitation constante est assurée par un barreau magnétique ; cette agitation provoque un rinçage constant des disques par le liquide aéré. L'ensemble est placé dans une enceinte où la température se situe entre 25 et 27°C.

c) Maintien des rondelles en atmosphère humide.

Cette technique a été rarement mise en oeuvre : elle consiste à placer les rondelles entre deux couches de papier filtre humide, sur une boîte de Pétri, en atmosphère à 25°C (technique de ASAHI et al., 1966).

d) Milieu aéré par injection d'air comprimé.

Les rondelles sont introduites dans des entonnoirs munis d'une plaque de verre fritté et emplis d'eau distillée ; l'air comprimé est injecté par la partie inférieure : une aération intense est ainsi réalisée (technique de COTTE-MARTINON et al., 1969).

C - OBTENTION DES FRACTIONS CELLULAIRES.
=====

Les fractions cellulaires sont isolées de tranches de tubercule fraîches ou de tranches en survie. L'isolement est parfois directement effectué sur le parenchyme central du tubercule intact.

Nous décrirons tout d'abord les techniques d'obtention des fractions brutes, puis les méthodes de purification des fractions sur gradient de saccharose.

1) Techniques d'obtention des fractions cellulaires brutes.

Plusieurs méthodes ont été utilisées au cours de ce travail.

a) Technique de base adaptée de celle de BARKER et al., 1968.

Les rondelles sont laissées une demi-heure dans la solution de broyage ayant la composition suivante : saccharose (0,4M), chlorhydrate de cystéine (4mM), chlorure de Magnésium (1mM), chlorure de Potassium (10mM), éthylène-diamine tétraacétique (10mM), sérum albumine de Boeuf (0,75 mg/ml), tampon Tris-HCl à pH 7,5 (10mM). Pour 1 g de matière fraîche, on utilise 1 ml de ce milieu de broyage. L'ensemble est placé dans de la glace et le reste des manipulations est ensuite effectué à une température d'environ +2 à +4°C. Les rondelles sont infiltrées sous vide pendant 10 minutes et broyées directement entre les 2 rouleaux en acier inoxydable du moulin de JONES et HULME (1961). Le pH est vérifié avec soin et maintenu pendant le broyage à une valeur voisine de 7,5 à l'aide de quelques gouttes d'une solution concentrée de Tris. Le broyat est passé sur deux épaisseurs de tissu à beurre, ce qui permet de retirer la plus grande partie des débris cellulaires, des parois pectocellulosiques et des cellules non broyées. Le filtrat est ensuite homogénéisé à l'aide d'un appareil de Potter à piston en téflon (trois allers et retours du piston manié à la main suffisent).

Lorsque l'on veut isoler les fractions cellulaires du tubercule entier, on prélève de gros morceaux dans la partie centrale, on les plonge dans le milieu de broyage décrit plus haut et on les broie avec un moulin

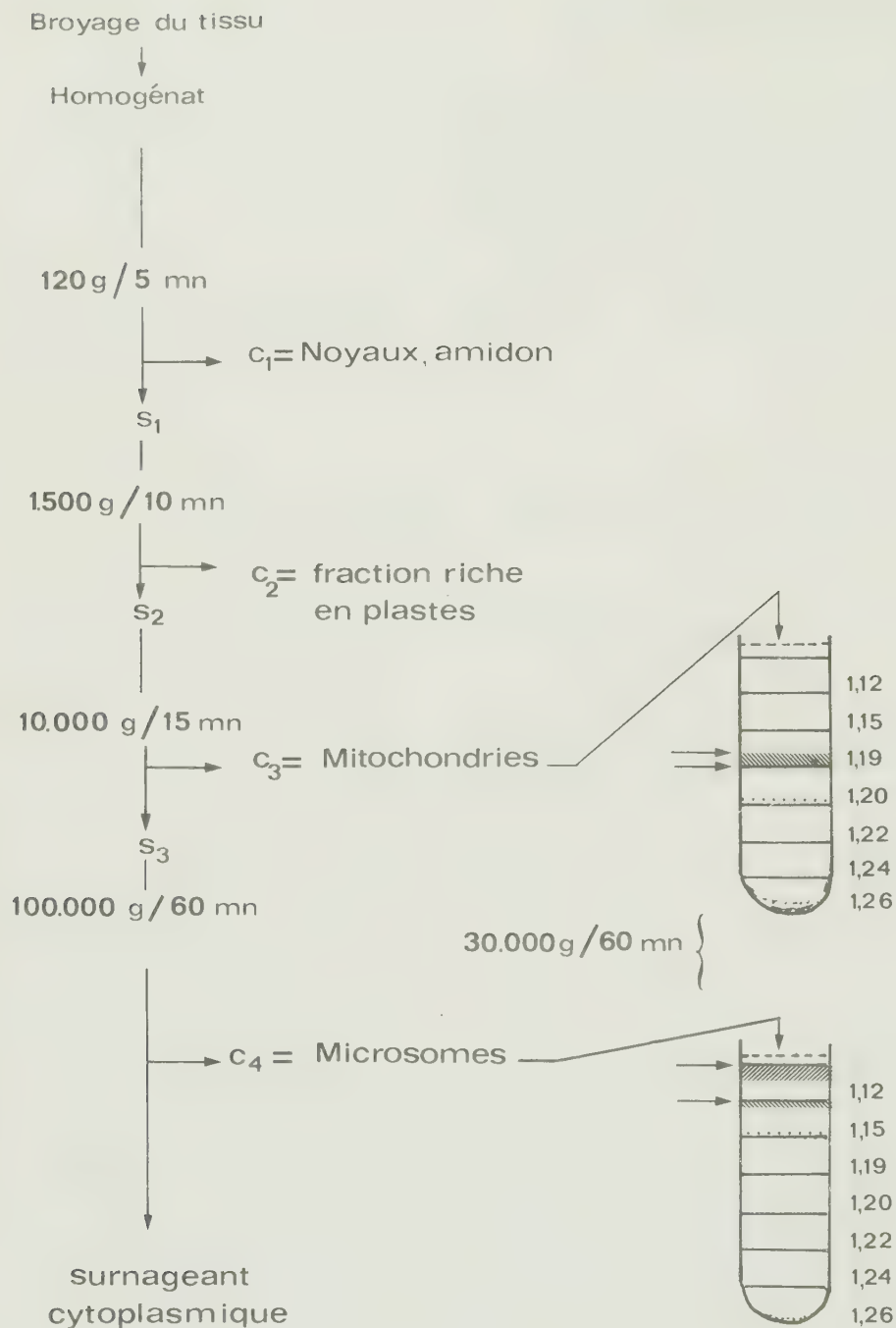


Fig. 2

Méthode d'isolement des fractions cellulaires du tubercule de pomme de terre : schéma général.

Les abréviations c désignent les culots des différentes centrifugations; les abréviations s indiquent les surnageants obtenus. Les nombres portés le long des tubes rappellent les densités des différentes couches du gradient de saccharose.

à légumes (Moulinex) (en chambre froide) ; la suspension de fragments de tissus est infiltrée sous vide. Le broyage est alors effectué au moulin de JONES et HULME (1961), le reste des opérations se déroule comme il a été décrit plus haut.

L'homogénat obtenu à partir de tranches de tissu ou du tubercule entier est alors soumis à des centrifugations d'accéléérations croissantes, réalisées grâce à la centrifugeuse International (HR1 ou B 20) (Rotor 870) (*Fig. 2*).

La première centrifugation à 120 g pendant 5 mm donne un culot contenant les grains d'amidon, les débris cellulaires et quelques noyaux ; on obtient un culot ne contenant plus de grains d'amidon, mais des plastes amylières, quelques mitochondries et des peroxysomes (ainsi que nous l'ont révélé les examens systématiques de toutes nos fractions au microscope électronique).

La fraction mitochondriale brute est recueillie par centrifugation du surnageant à 10.000 g pendant 15 minutes. Les culots sont rassemblés et homogénéisés dans un milieu de lavage, ayant la même composition que le milieu de broyage, exceptés la cystéine, le chlorure de potassium, et contenant en outre du tampon phosphate (0,1M). Une centrifugation à 8.000 g pendant 10 minutes donne un culot mitochondrial lavé qui est remis en suspension dans un volume connu de milieu de lavage.

Dans certaines expériences (en particulier dans les travaux concernant les échanges de lipides), où les quantités de tissu manipulées sont grandes, on évite les centrifugations préliminaires à faible vitesse en faisant passer l'homogénat (broyat de tissu passé sur tissu à beurre) dans un entonnoir à plaque de verre fritté n°3 (technique de DUCET et al., 1970) ; les grains d'amidon et les gros débris cellulaires sont retenus sur la plaque et le filtrat est centrifugé directement à 10.000 g pendant 15 minutes, ce qui donne un culot mitochondrial brut (cette opération s'effectue dans les tubes de 250 ml du rotor 21, International B 20).

Les culots mitochondriaux obtenus selon l'une ou l'autre technique ont une couleur brunâtre ; ils sont surmontés d'une couche légère de couleur jaune (constituée essentiellement de microsomes contaminants) qui s'élimine au cours du lavage.

La fraction microsomale brute est obtenue par centrifugation du surnageant des mitochondries à 100.000 g pendant une heure (rotor 30.1,

Spinco Beckman ; 31.000 tours/minute). Les culots obtenus sont d'une couleur jaune vif caractéristique ; on observe une petite zone inférieure de couleur orangée. Les culots microsomaux sont rassemblés dans un volume connu de milieu de broyage et remis en suspension dans une petite cuve de Potter de 5 ml de capacité à l'aide d'un piston en téflon manié à la main.

La phase surnageante finale est appelée "surnageant cytoplasmique". Elle représente la phase liquide du cytoplasme diluée par le milieu de broyage.

b) Technique adaptée de celle de VERLEUR (1965).

Au début de notre travail, nous avons utilisé une technique adaptée de celle utilisée par VERLEUR (1965) dans laquelle le milieu de broyage a la composition suivante : mannitol (0,7 M), sérum albumine (0,1%), cystéine (2 mM), EDTA (1 mM) ; nous avons apporté les modifications suivantes à cette technique : le pH du milieu de broyage est plus élevé (7,0 au lieu de 6,5), broyage à l'aide du moulin de JONES et HULME (1961), préfiltration sur entonnoir à plaque de verre fritté (DUCET et al., 1970). La suite des opérations se déroule comme dans la technique que nous venons de décrire.

Les raisons pour lesquelles nous avons abandonné cette technique seront exposées dans la suite du Mémoire.

c) Technique utilisant un milieu de broyage enrichi en magnésium.

Dans certaines expériences, l'enrichissement du milieu de broyage en magnésium s'est révélé nécessaire pour observer d'une façon plus nette les structures cellulaires isolées ou pour s'assurer de bonnes conditions d'isolement des fractions microsomaux, en particulier. A cet effet, il nous a suffi d'inverser le rapport des concentrations d'éthylène-diamine tétraacétique et de chlorure de magnésium ; le premier produit est introduit dans le milieu à la concentration de 1 mM au lieu de 10 mM, le chlorure de magnésium est ajouté à la concentration de 10 mM au lieu de 1 mM. Le protocole expérimental est ensuite conduit comme indiqué dans le paragraphe a.

2) Techniques de purification.

On prépare des solutions de saccharose de différentes densités en ayant soin d'introduire dans ces solutions les produits suivants : sérum albumine de Boeuf (0,75 mg/ml), chlorure de potassium (1 mM), Tris (50 mM), phosphate monopotassique (10 mM), à pH 7,5. Les solutions de saccharose de densité variant de 1,05 à 1,26 sont alors déposées dans un tube en nitrate de cellulose dans l'ordre indiqué sur la *figure 2*. On empêche le mélange de deux solutions successives de densité inférieure (technique de DUCET, 1966). Un ml de suspension mitochondriale ou microsomale brutes est déposé à la surface de la solution la moins dense en faisant couler la suspension le long de la surface intérieure du tube.

Les tubes sont alors centrifugés à 30.000 g pendant 1 heure (SPINCO BECKMAN) (Rotor SW 25.1).

Dans le tube où a été déposée la suspension mitochondriale, on observe surtout une bande importante dans la couche de densité 1,19. D'autres bandes moins nettes existent : couche légère jaunâtre (dans la bande de densité 1,12) due aux microsomes. La couche de densité 1,19 est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée (ou dans nos premières expériences, en perçant le fond du tube). On ajuste la molarité de cette solution en ajoutant 5 à 6 volumes du milieu de lavage et on centrifuge ensuite le tout à 10.000 g pendant 15 minutes ; le culot obtenu, de couleur brune, est appelé *fraction mitochondriale pure*.

Dans le tube où a été déposée la suspension microsomale, on n'observe pratiquement que deux bandes de couleur jaune vif aux densités 1,12 et 1,15 ; la plus importante est la plus lourde. Ces bandes, rassemblées et centrifugées à 100.000 g pendant une heure, donnent la *fraction microsomale pure*.

D - CONTROLES BACTERIOLOGIQUES.

Nous avons évoqué les précautions que nous prenons pour éviter des contaminations importantes par des populations bactériennes. Une grande aide nous est apportée dans ce problème par le tubercule de Pomme de terre lui-même, dont le parenchyme central est dépourvu de germes ; il faut

TABLEAU II

Détermination du nombre de bactéries présentes dans les fractions cellulaires et les tissus avant et après survie.

	Bactéries / ml de suspension isolée de 50 g de tissu	
	Tissu frais	Tissu en survie
MITOCHONDRIES		
avant incubation	10^5	10^5
après incubation	10^4	10^5
MICROSOMES		
avant incubation	10^4	$3 \cdot 10^3$
après incubation	10^3	10^4
SURNAGEANT	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$

cependant que le tubercule soit sain, exempt de blessures ou de maladies, et nous avons pris toutes nos précautions pour éliminer les tubercules présentant ces défauts.

Une première indication précieuse est apportée par les contrôles morphologiques qui n'ont jamais révélé la présence de bactéries dans les culots mitochondriaux ou microsomaux étudiés.

Une détermination plus directe a été faite à l'Institut de microbiologie d'Orsay où nous avons procédé à des ensemencements de nos fractions cellulaires sur boîte de Pétri contenant un milieu nutritif.

Le tableau II indique qu'un nombre faible de germes microbiens sont présents dans les culots mitochondriaux isolés de 50 g de tubercule : on trouve 10^5 germes par ml. Cette valeur est négligeable pour les microbiologistes et ne peut donc interférer sur les résultats de nos expériences. LANCE (1971) signale des valeurs analogues.

Dans nos expériences, il fallait nous assurer que pendant la survie, qui nécessite le maintien des disques à 25°C pendant un long temps d'expérience, ne se développaient pas de populations bactériennes : l'emploi de chloramphénicol dans le milieu de survie ou l'utilisation de techniques de prélèvement aseptiques (récipients et eau distillée stériles, etc.) suppriment d'éventuelles pullulations bactériennes. Le tableau II montre qu'aucun accroissement du nombre de germes ne s'observe lorsque l'on maintient les tissus en survie.

Les précautions d'asepsie sont indispensables ; ainsi dans certains cas, des contaminations accidentelles par d'autres organismes que les bactéries peuvent avoir lieu : des organismes analogues à des champignons unicellulaires peuvent se multiplier sur les tissus ; cependant les risques d'une telle contamination sont beaucoup moins élevés et les précautions d'asepsie suppriment ces contaminations exceptionnelles.

(Il était intéressant, dans le même ordre d'idées, d'apprécier les risques de contamination bactérienne pendant l'incubation *in vitro* des fractions cellulaires isolées : en 2 heures (temps choisi généralement pour les expériences mettant en jeu l'incorporation de précurseurs radioactifs), aucune augmentation du nombre des germes ne se produit).

Nous pouvons donc affirmer que les résultats que nous présentons dans ce travail - aussi bien concernant la survie que les fractions cellulaires isolées - ne peuvent être en aucun cas attribués à des

contaminations par des microorganismes.

E - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Dans la plupart des observations en microscopie électronique, nous nous sommes contentés de faire les étapes préliminaires de la fixation et du lavage des échantillons, le reste des manipulations étant effectué dans les laboratoires qui nous ont apporté leur aide. Cependant dans certaines expériences, nous avons nous-mêmes effectué une partie des manipulations qui suivent la première fixation.

Les culots d'organites sont fixés (*tableau III*) dans tous les cas à la glutaraldéhyde tamponnée (glutaraldéhyde TAAB ou FISCHER) ; les concentrations de glutaraldéhyde sont égales à 4 ou 5%. Elles sont tamponnées au tampon phosphate (0,1M) pH 7,0. Après 45 minutes de fixation, les culots fixés sont lavés au tampon cacodylate ou au tampon phosphate, et postfixés à l'acide osmique (1 à 2%). Une préinclusion à la gélose a été parfois effectuée avant la postfixation à l'acide osmique.

Après la série de déshydratations à l'alcool ou à l'acétone, on procède à l'inclusion à l'araldite ou à l'Epon en utilisant des mélanges intermédiaires d'oxyde de propylène et du polymère.

L'inclusion dans le polymère a lieu dans les gellules à 60°C.

Les fragments de tissus sont traités d'une façon analogue.

F - EXAMEN DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ASSOCIEES AUX FRACTIONS CELLULAIRES.

1) Techniques polarographiques.

Pour suivre l'activité respiratoire des mitochondries, nous avons utilisé la technique polarographique qui permet de mesurer de façon continue les concentrations d'oxygène dissout dans un milieu. L'appareil utilisé est un oxygraphe GILSON, modèle KM à électrode de platine vibrante, recouverte d'un film de téflon de 0,01 mm ; cette électrode est réunie à l'électrode de référence au calomel par l'intermédiaire d'un pont de chlorure de potassium.

La cellule de mesure est maintenue à 25°C pendant l'expérience.

On introduit dans la cellule de mesure 1,8 ml du milieu suivant : saccharose (0,25M), chlorure de magnésium (5 mM), acide éthylène diamine tétraacétique (0,5 mM), sérum albumine de Boeuf (0,75 mg/ml), tampon TRIS (10 mM), phosphate monopotassique (10 mM). On introduit successivement, selon un ordre strict qui sera justifié par la suite, 0,1 ml de suspension mitochondriale (obtenue à partir d'une quantité connue de matière fraîche), 0,1 ml de succinate de sodium (0,1 M) et à plusieurs reprises 100 µM d'adénosine diphosphate.

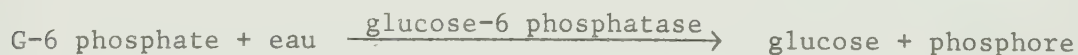
2) Activités enzymatiques.

a) NADH- et succinate-cytochrome c réductase.

On suit spectrophotométriquement la réduction du cytochrome c exogène par la fraction cellulaire (HACKETT et al., 1960). Les cuves de mesure contiennent dans les deux cas, 0,4 ml de cytochrome c (3 mg/ml), 0,4 ml de cyanure de sodium (3,25 mg/10 ml) et 0,7 ml de tampon Tris-HCl, pH 7,5. On ajoute ensuite 0,1 ml de suspension d'organites. Dans une cuve expérimentale témoin, on introduit 0,4 ml de solution tampon. Dans les cuves d'essai, on déclenche la réaction soit en ajoutant 0,4 ml de NADH (0,3mM) (si l'on veut suivre la NADH cytochrome c réductase) ou 0,4 ml de succinate (si l'on veut suivre la succinate cytochrome c réductase). Tous ces produits sont dissouts dans une solution de tampon Tris-HCl à pH 7,5 (10 mM).

b) Glucose-6 phosphatase.

L'activité de la glucose-6 phosphatase est déterminée selon la méthode de HARPER (1965). Cette technique dose le phosphore libéré à partir du glucose-6-phosphate :



La réaction se déroule à 37°C pendant 15 minutes, dans un tube contenant 0,1 ml d'une solution de glucose-6-phosphate (0,08 M) et 0,1 ml

TABLEAU III

Préparation des échantillons pour la microscopie électronique.

FIXATION	Glutaraldéhyde 5% dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7.0 (12 heures pour les tissus à température ambiante 2 heures pour les culots à 0 - + 4°C)
POST-FIXATION	Acide osmique 1% dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7.0
DESHYDRATATION	Acétone (30, 70, 90, 100%) pendant 30 mn à chaque fois
INCLUSION	1. Mélange oxyde de propylène - Epon (2/3 ; 1/3) 2. Epon pur pendant 12 heures à la température ambiante 3. Polymérisation (60°C pendant 48 heures)

de suspension microsomale par exemple. On analyse aussi deux tubes témoins contenant l'un, 0,1 ml de tampon citrate (pH 6,5) à la place de la suspension microsomale et l'autre 0,1 ml de tampon citrate à la place d'une solution de glucose-6-phosphate. Après 15 minutes à 37°C, à pH final égal à 6,5 (cette précision est importante car, à des pH voisins, d'autres enzymes peuvent dégrader le glucose-6-phosphate), on précipite les protéines avec 2 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 10% et on centrifuge le tout à 5.000 g pendant 10 minutes. On dose le phosphore contenu dans le surnageant par la technique de FISKE et SUBBAROW : à 1 ml de surnageant, on ajoute 5 ml d'une solution de molybdate d'ammonium (2 mM) et 1 ml d'un mélange d'hydrosulfite, de thiosulfite de sodium et d'acide 1-amino-2-naphtol-4 sulfonique (42 mM).

Après 15 minutes, on dose, par spectrophotométrie à 820 nm, le phosphore présent dans le surnageant, par référence à une solution de phosphate monopotassique de concentration connue ($5 \cdot 10^{-4}$ M).

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de phosphore libérées par minute et par mg de protéines.

G - FOURNITURE DES PRECURSEURS RADIOACTIFS.

1) Provenance des précurseurs radioactifs utilisés.

Le $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate de sodium (radioactivité spécifique 55,5 mCi/mmole), le $[^{32}\text{P}]$ -phosphate de sodium (radioactivité spécifique 10 mCi/mmole), le $[1-^{14}\text{C}]$ -glycérol (15 mCi/mmole), le $[1-^{14}\text{C}]$ -anhydride acétique (48 mCi/mmole), la $[^3\text{H}]$ -leucine (50 mCi/mmole), le $[1-^{14}\text{C}]$ -acide oléique (51,2 mCi/mmole), le $[1-^{14}\text{C}]$ -acide palmitique (49,2 mCi/mmole), le $[1-^{14}\text{C}]$ -acide stéarique (46,8 mCi/mmole) sont fournis par le CEA, France. La $[\text{Me}^{14}\text{C}]$ -choline (2 mCi/mmole) a été fournie par la compagnie NEN Chemicals, Allemagne.

Le $[1-^{14}\text{C}]$ -acétyl-CoA a été préparé au laboratoire à partir de 1' $[1-^{14}\text{C}]$ -anhydride acétique selon la méthode de SIMON et SHEMIN (1953).

Le $[1-^{14}\text{C}]$ -oléyl-CoA, le $[1-^{14}\text{C}]$ -palmityl-CoA et le $[1-^{14}\text{C}]$ -stéaryl-CoA ont été préparés au laboratoire à partir des acides gras radioactifs selon la méthode de GALLIARD et STUMPF (1968) modifiée par MAZLIAK.

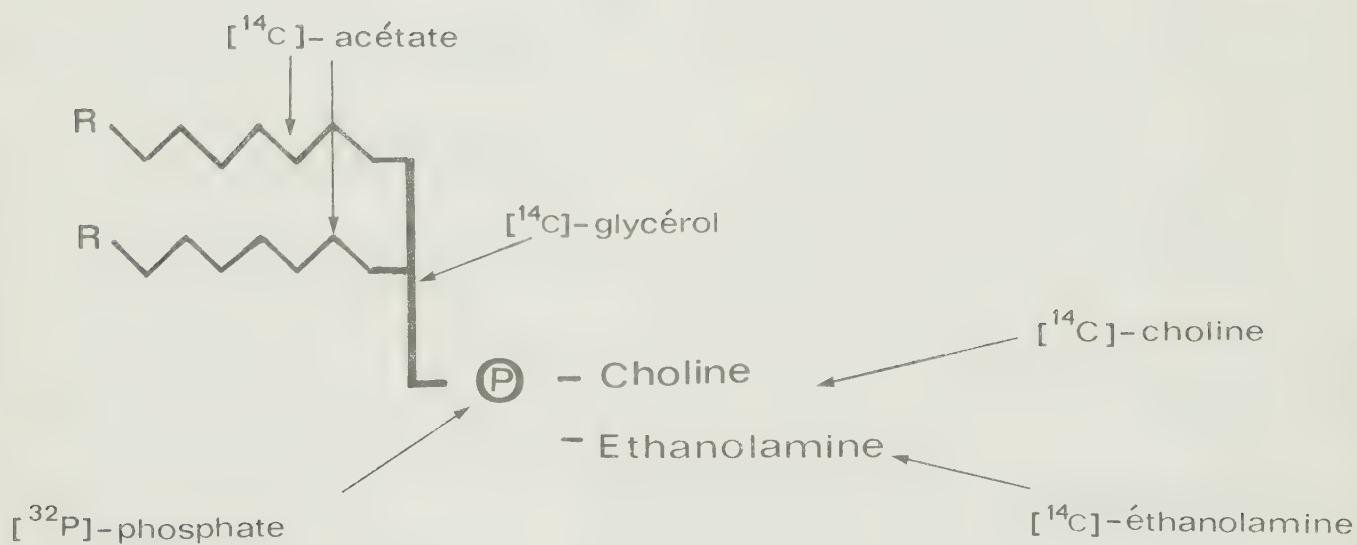


Fig. 3

Marquage spécifique d'une molécule de phospholipide à partir de précurseurs radioactifs différents.

2) Choix du précurseur.

Le choix du précurseur dépend de la partie de la molécule lipidique que l'on veut étudier (*Fig. 3*). Nous avons largement utilisé l' $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate de sodium qui est un précurseur bien connu des acides gras. Ce précurseur va nous permettre de suivre le devenir des molécules d'acides gras et parfois le devenir des molécules lipidiques toutes entières. Le phosphate de sodium marqué au ^{32}P permet de repérer les restes d'acide phosphorique des molécules phospholipidiques ; un marquage à la $[\text{Me}^{14}\text{C}]$ -choline facilite l'étude particulière de la phosphatidylcholine. Le squelette glycérol de ces molécules peut être marqué par le glycérol $[1-^{14}\text{C}]$.

Nous avons suivi dans les mêmes conditions expérimentales les synthèses protéiques et lipidiques en introduisant dans le milieu d'incubation de la $[^3\text{H}]$ -leucine pour marquer les protéines et l' $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate ou du $[^{32}\text{P}]$ -phosphate pour suivre les lipides. On peut mesurer la radioactivité des constituants protéiques ou lipidiques grâce aux différences d'énergie associée à ces isotopes radioactifs.

3) Conditions d'incubation.

a) Tissu entier.

Les tranches de tissu sont placées dans un Erlenmeyer contenant la solution radioactive. Il est important de ne pas introduire un trop grand nombre de rondelles dans un volume donné de liquide : ainsi, pour des rondelles de 2 mm d'épaisseur, on a utilisé 10 ml de solution pour 30 rondelles. Dans certaines expériences, la solution radioactive est déposée directement à la surface des rondelles. La fiole est agitée constamment dans un bain maintenu à 25°C pendant la durée de l'expérience. A la fin de l'incubation, les rondelles sont abondamment rincées à l'eau distillée.

b) Suspensions d'organites.

Dans une fiole de Warburg, on introduit un volume déterminé de suspension d'organites (généralement 0,5 à 1 ml) et une solution contenant le précurseur radioactif ainsi que divers cofacteurs (1 à 2 ml). La composition de la solution variant à chaque expérience sera indiquée dans le texte. L'ensemble est agité dans un bain à température constante (25°C) pendant la durée de l'expérience. A la fin de l'incubation, la suspension d'organites est plongée dans du méthanol bouillant et les lipides sont extraits.

H - EXTRACTION DES LIPIDES.

1) Extraction des lipides totaux.

a) Tissu entier.

Les tranches de tissu sont plongées dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes pour inactiver les phospholipases (BENSON et STRICKLAND, 1960 ; DOUCE, 1964). On décante ensuite l'eau (qui est gardée pour la suite des opérations). Les tranches sont broyées au mortier (ou à l'ultra-Turrax) avec 10 ml de méthanol (pour 15 rondelles). On ajoute ensuite 10 ml de chloroforme, puis de l'eau salée (1 g de NaCl pour 100 ml) et l'eau qui a servi à la fixation du tissu (10 ml en tout). Chaque addition est suivie d'un brassage énergique (technique de FOLCH et al., 1957 ; BLIGH et DYER, 1959). Le contenu de chaque mortier ou tube est transféré quantitativement, dans un tube de centrifugation, après rinçage avec 5 ml de chloroforme ; après centrifugation à 2000 g environ pendant 10 minutes, on obtient une couche chloroformique inférieure d'une couleur jaune vif qui est prélevée à la pipette Pasteur, transvasée dans une ampoule. Le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide ; un volume connu de benzène/éthanol (4/1) est rapidement ajouté au résidu sec : la solution lipidique peut se conserver jusqu'à un an au freezer à -20°C sans altération importante (VORBECK et MARINETTI, 1965).

b) Suspension d'organites.

On utilise la technique de BLIGH et DYER (1959). 4 ml de suspension ou de mélange mis en incubation sont plongés dans une cuve de Potter contenant 10 ml de méthanol bouillant (si le volume de la suspension est inférieur à 4 ml, on complète avec de l'eau distillée). On refroidit rapidement l'ensemble avec de l'eau glacée et on complète à 14 ml avec du méthanol, s'il y a lieu.

On ajoute ensuite 5 ml de chloroforme, on homogénéise à l'aide d'un piston en téflon manié à la main (3 allers et retours) ; à ce stade une seule phase doit être visible. Puis on ajoute de nouveau 5 ml de chloroforme (nouvelle homogénéisation) ; la démixion des phases est assurée par l'addition de 5 ml d'une solution de NaCl dans l'eau (environ 1 g pour 100 ml). L'ensemble est transféré dans un tube à centrifugation et centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes ; la couche chloroformique recueillie est traitée comme il a été décrit plus haut.

2) Extraction et méthylation des acides gras.

Nous avons utilisé la technique de METCALFE et al. (1966) modifiée par LECHEVALLIER (1966). Une partie aliquote de la solution lipidique brute est évaporée dans un tube en pyrex ; on ajoute au fond du tube 5 ml de soude méthanolique (0,5 M) et on bouche le tube avec un bouchon rodé ; après 15 mn à 65°C, on ajoute 3 ml d'une solution de trifluorure de Bore dans le méthanol (14%) (Applied Science Laboratories) ; le tube est de nouveau maintenu à 65°C pendant 5 minutes. On refroidit alors le tube avec de l'eau glacée et on extrait les esters méthyliques avec 10 ml de pentane pur (dans certaines expériences, on introduit 5 ml d'eau distillée avant d'ajouter le pentane) ; un deuxième épuisement avec 5 ml de pentane est effectué.

Le solvant est évaporé et le résidu est dissout dans un volume connu de pentane (en général 10 ml) ; une partie aliquote est prélevée éventuellement pour la détermination de la radioactivité de la solution. Le solvant est évaporé à nouveau et les esters méthyliques sont repris dans un volume connu d'une solution d'ester méthylique d'acide heptadécanoïque dans le méthanol ; l'addition d'une quantité connue de cet acide

gras exogène permet le dosage des acides gras.

3) Détermination de la radioactivité des solutions lipidiques.

Une partie aliquote de la solution de lipides totaux ou d'acides gras (0,2 à 0,5 ml) est plongée dans 5 ml du mélange scintillant de PPO (0,5%) et de diméthyl POPOP (0,03%) dans du toluène. La mesure de la radioactivité est effectuée par scintillation liquide (spectromètre Tricarb Packard, modèle 3214).

I - ANALYSE DES LIPIDES BRUTS.

Des techniques chromatographiques différentes ont été mises en oeuvre pour séparer d'une part les classes de lipides (phospholipides, galactolipides, lipides neutres, etc...) et d'autre part les phospholipides entre eux.

1) Séparation des classes lipidiques.

a) Chromatographies sur couche mince.

a₁ - Techniques générales.

Des couches minces (0,25 mm) de gel de silice (silicagel G, Merck) sont déposées sur des plaques de verre (20 x 20 cm) à l'aide d'un étaleur DESAGA (30 g de gel de silice pour 60 ml d'eau distillée).

Les plaques sont activées à 110°C pendant 30 minutes avant leur utilisation. La solution lipidique est déposée rapidement sous courant d'azote au bas de la couche de silice.

a₂ - Technique de MANGOLD (1961) (1964).
.....

Le mélange de solvants préconisé par MANGOLD (*Tableau IV*) permet de séparer les catégories lipidiques en phospholipides (qui restent sur la ligne de départ), galactolipides (très mal séparés des phospholipides), di- et triglycérides ; les spots sont rendus visibles par vapeurs d'Iode, ou par aspersion d'acide sulfurique à 50%, suivie d'un chauffage à 110°C pendant quelques minutes.

a₃ - Technique de GARDNER (1968) modifiée par GRENIER et al. (1972).
.....

Cette technique permet une séparation satisfaisante des phospholipides et des galactolipides, en réalisant un double développement ; on laisse migrer le premier solvant jusqu'à la moitié de la hauteur de la plaque ; puis, après séchage, on remet à développer la plaque dans le 2ème mélange. Dans ces conditions les phospholipides et galactolipides sont séparés d'une façon satisfaisante. Les constituants sont rendus visibles par aspersion de Rhodamine 6 G (Edward Gurr) (1°/oo), et observés à la lumière ultra-violette (une brève exposition aux vapeurs d'Iode permet de mieux observer les taches). Une autre technique consiste à asperger les plaques d'une solution alcoolique d' α -naphtol à 0,5%, à les sécher, puis à asperger de l'acide sulfurique à 50% ; le chauffage graduel de la plaque fait apparaître les galactolipides sous une couleur violette caractéristique. Les spots correspondant aux stéryl glucosides libres ou estérifiés (LEPAGE, 1964) se colorent en rouge après aspersion d'acide perchlorique à 20% et chauffage.

b) Chromatographie sur colonne.

b₁ - Acide silicique.
.....

VORBECK et MARINETTI (1965) ont mis au point un système de chromatographie sur colonne basé sur l'absorption et l'élution sélectives des différentes classes lipidiques. 10 à 15 g d'acide silicique (MALLINCKRODT,

100 mesh) sont activés pendant une nuit à 110°C; on met en suspension l'acide silicique dans 75 ml d'heptane et on introduit le mélange dans une colonne à chromatographie de 15 mm de diamètre. Le tableau IV indique les conditions de l'élution des différents constituants lipidiques. Les éluats sont évaporés, repris dans un volume connu de chloroforme et analysés par d'autres techniques chromatographiques (sur papier ou sur couche mince).

b₂ - DEAE-cellulose.
.....

Cette technique chromatographique a été conduite selon les indications de ROUSER et al. (1964). Elle permet de séparer trois fractions lipidiques globales.

2) Séparation des phospholipides.

Les analyses ont porté soit directement sur la solution de lipides bruts soit sur un éluat de la bande riche en phospholipides après chromatographie des lipides bruts selon le système de GARDNER-GRENIER (dans ce dernier cas, élution à l'aide du mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (97/97/4/2) (GALLIARD, 1968)).

a) Chromatographie sur couche mince.

Le mélange de solvants préconisé par NICHOLS (1964) permet de séparer assez bien les phospholipides entre eux. Les spots des phospholipides peuvent être récupérés et soumis à d'autres analyses.

La technique bidimensionnelle de LEPAGE (1964) réalise une séparation convenable de la presque totalité des phospholipides et des autres lipides existant dans l'extrait lipidique total des tissus que nous avons examinés.

Les phospholipides sont mis en évidence par les réactions colorées déjà évoquées : vapeurs d'Iode, acide sulfurique ; en outre des réactions plus caractéristiques sont possibles ; par exemple, aspersion de ninhydrine

(0,2% dans un mélange d'acétone et de lutidine 9/1 (V/V), révèle les phospholipides à fonction aminée libre (phosphatidyléthanolamine ou phosphatidylsérine) (obtention de taches violettes).

En plaçant les chromatogrammes sur couche mince qui ont séparé une solution de lipides radioactifs, au contact d'une émulsion sensible (Kodak, Kodirex), on peut déterminer la distribution de la radioactivité des différents phospholipides. A cet effet, il est préférable d'utiliser pour séparer les phospholipides une plaque de gel de silice vendue toute préparée (Merck) et qui a l'avantage de posséder une couche mince de silice très cohérente et non pulvérulente comme celles obtenues au laboratoire. Cependant les comportements chromatographiques des lipides sont légèrement modifiés.

b) Chromatographie sur papier silicé.

Cette technique, mise au point par MARINETTI et STOTZ (1956), permet de réaliser une séparation très satisfaisante des phospholipides entre eux, dans un développement unique ; après dépôt des lipides au bas d'une feuille de papier Whatman Chromédia (SG 8 1), on laisse migrer le solvant sur le papier pendant 24 heures ; le mélange de solvants (Tableau IV) diffère de celui initialement donné par MARINETTI et STOTZ par la quantité d'eau (16 ml) inférieure à celle indiquée par les auteurs (20 ml). Ce point est très important pour réaliser une bonne séparation chromatographique. Enfin l'acide acétique utilisé doit être d'une pureté égale à 99-100%.

Après le développement, le chromatogramme est séché rapidement et plongé dans une solution de Rhodamine 6 G (concentration finale 1°/oo). Cette révélation est spécifique : les phospholipides acides comme le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol, le diphosphatidylglycérol apparaissent en bleu, les phospholipides basiques, comme la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine apparaissent respectivement en orange ou en rose pâle. Les galactolipides ont une couleur jaune assez prononcée.

Une autre technique de visualisation a été indiquée par KAS et al. (1969) : les chromatogrammes sont séchés et trempés dans une solution de fuchsine acide à 0,02%, en solution dans le nitrate d'uranium 0,2%

TABLEAU IV

Conditions expérimentales des chromatographies réalisées pour l'analyse des lipides.

AUTEURS	MELANGE DE SOLVANTS	TECHNIQUES
MANGOLD (1961)	éther de pétrole/éther éthylique/ acide acétique (90/10/1) (v/v/v)	couche mince unidimensionnelle
GARDNER (1968)	acétone/acide acétique/eau (100/2/1) (v/v/v)	" "
NICHOLS (1964)	chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (170/25/25/4) (v/v/v)	" "
LEPAGE (1964)	1/ chloroforme/méthanol/eau (65/25/4) (v/v/v) 2/ diisobutylcétone/acide acétique/eau (80/50/10) (v/v/v)	couche mince bidimensionnelle
MARINETTI et STOTZ (1956)	diisobutylcétone/acide acétique/eau (160/100/16) (v/v/v)	papier silicé (Whatman SG81)
MARUO et BENSON (1958) DOUCE (1964)	Phénol/eau (100/38) (v/v/v) Méthanol/acide formique/eau (80/13/7) (v/v/v)	Papier Whatman n°2
GARDNER (1968) GRENIER et al. (1972)	1/ acétone/acide acétique/eau (100/2/1) 2/ éther de pétrole/acide acétique/ éther éthylique (90/1/10) (v/v/v)	couche mince unidimensionnelle
MORRIS et al. (1967)	toluène (-20°C)	" "

CONDITIONS D'ELUTION POUR LES CHROMATOGRAPHIES
SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE SELON VORBECK et MARINETTI (1965)

Mélange solvants	Volume	Lipides élués
Chloroforme	60 ml	lipides neutres et pigments
Chloroforme/acétone (1/1)	60 ml	monogalactosyl et digalactosyldiglycérade
Acétone	60 ml	digalactosyldiglycérade
Méthanol	180 ml	phospholipides

et d'acide chlorhydrique à 0,01N. Après 20 minutes, on rince avec la solution précédente sans fuchsine acide et on les sèche. Les phospholipides apparaissent en rose intense.

Les chromatogrammes peuvent être mis au contact d'une émulsion photographique si les lipides analysés sont radioactifs (cf plus haut) ; on peut aussi découper les spots correspondant aux lipides marqués et, en introduisant les bandes de papier dans un flacon contenant 5 à 15 ml de mélange scintillant, déterminer la radioactivité de chaque spot phospholipidique.

c) Chromatographie des phospholipides désacylés.

Pour identifier avec plus de certitude les analyses de phospholipides données par les techniques de chromatographie portant sur les phospholipides intacts, il est utile d'analyser les phospholipides, préalablement débarrassés de leurs acides gras (MARUO et BENSON, 1958) (DOUCE, 1964) (DAWSON, 1967). Les phospholipides préalablement marqués au ^{32}P sont désacylés selon la méthode de DAWSON (1967). La solution aqueuse des phospholipides désacylés est chromatographiée sur papier Whatman n°2 selon les indications de DOUCE (1964) (*tableau IV*). La mise en évidence des esters phosphorés est effectuée par autoradiographie sur film Kodirex.

J - ANALYSE DES ACIDES GRAS.

1) Acides gras des lipides totaux.

Les esters méthyliques des acides gras totaux sont obtenus après traitement des lipides bruts par les techniques décrites ci-dessus. Les esters méthyliques sont séparés, identifiés, dosés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales décrites par ailleurs (BEN ABDELKADER, 1968). La séparation des différents isomères des acides monoéthyléniques a été réalisée par chromatographie sur couche mince de silice-nitrate d'argent selon la technique de MORRIS et al. (1967). Le dosage des acides gras séparés par chromatographie en phase gazeuse s'ef-

fectue après estimation par triangulation de la surface du pic correspondant à l'acide heptadécanoïque qui a été ajouté en quantité connue.

Lorsque sont analysés les acides gras radioactifs, la distribution de la radioactivité parmi ces différents acides est déterminée à l'aide d'un radiochromatographe en phase gazeuse (Barber Colman, Nuclear Chicago, série 5000). Dans cet appareil, une partie des vapeurs d'acides gras sortant de la colonne à chromatographie est brûlée par passage sur de l'oxyde de cuivre placé dans un four chauffé à 750°C ; les molécules de gaz carbonique radioactives sont détectées par un compteur proportionnel de radioactivité. L'appareil fournit un double enregistrement : le chromatogramme de masse donnant la composition de la solution d'esters méthyliques d'acides gras ainsi que la quantité totale de chaque acide et, d'autre part, le chromatogramme de radioactivité indiquant la distribution de la radioactivité totale entre les différents acides gras. Si l'on mesure, par scintillation liquide, la radioactivité totale de la solution d'acides gras analysée, on peut donc avoir la radioactivité spécifique de chaque acide gras exprimée en coups par minute par microgramme d'acide.

2) Acides gras des classes de lipides.

Les zones de silice correspondant aux classes de lipides ou aux différents phospholipides, prélevées sur des chromatogrammes selon NICHOLS (1964) ou GARDNER (1968) et GRENIER et al. (1972) sont directement introduites dans des tubes contenant 3 ml de la solution de catalyseur (trifluorure de Bore dans le méthanol) (technique de GRENIER et al., 1972). Après 30 minutes à 90°C en tube bouché, le tube est refroidi et 10 ml de pentane ainsi que 5 ml d'eau distillée sont ajoutés. Après agitation vigoureuse, on laisse décanter. Les esters méthyliques des acides gras des différents lipides sont ensuite analysés par radiochromatographie en phase gazeuse.

K - DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES.

Le dosage des phospholipides présents dans une solution lipidique ou la détermination des proportions relatives en masse des divers phospho-

lipides sont obtenus par dosage du phosphore lipidique. Le poids du phosphore est estimé représenter 1/25 du poids des divers phospholipides. Une autre technique (TREMOLIERES et LEPAGE, 1971 ; GRENIER et al., 1972) consiste à déterminer les proportions respectives des phospholipides en dosant les acides gras de chaque classe. On estime que les acides gras représentent 70% du poids des divers phospholipides.

1) Dosage du phosphore.

a) Technique de DUCET et VANDEWALLE (1959).

Cette technique classique consiste à doser spectrophotométriquement le phosphore libéré après minéralisation de la solution lipidique totale.

b) Technique de SHIBUYA et al. (1967).

La solution lipidique, placée dans un tube est évaporée ; on ajoute ensuite 1 ml d'une solution ayant la composition suivante : acide sulfurique (10 N/ acide périodique 0,1 N/ éthanol (3/1/6)). La réaction se poursuit à 100°C pendant 40 minutes. On ajoute ensuite 5 ml d'un mélange de molybdate d'ammonium (2,5%), d'une solution d'acide aminonaphtolsulfonique 0,1% / sulfite de sodium (0,2%) / bisulfite de sodium (6,0%), et d'eau (3/5/40, V/V/V). Après 10 minutes à 100°C, on refroidit les tubes et on lit à 820 nm. La gamme d'étalonnage est effectuée sur de la dipalmitoylglycérophosphoryléthanolamine de synthèse ; on a ainsi directement la quantité de phospholipides (La relation entre la densité optique et la quantité de phospholipides est linéaire jusqu'à 100 µg).

Ces techniques ont été utilisées sur des éluats de bandes de papier silicé correspondant aux différents phospholipides séparés par la chromatographie sur papier silicé. L'élution est effectuée par le mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (97/97/4/2).

2) Dosage des acides gras.

Les quantités de phospholipides peuvent être déterminées d'après le poids des acides gras qu'ils renferment. Les acides sont alors dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats obtenus concordent parfaitement avec ceux fournis par le dosage du phosphore lipidique.

L - DOSAGE DES PROTEINES.

1) Dosage de l'Azote protéique.

Dans nos premières expériences, nous avons dosé l'azote protéique grâce à la technique de THOMPSON et MORRISSON (1951) après minéralisation à l'acide sulfurique.

2) Méthode du Biuret.

Nous avons utilisé cette méthode plus largement que la première. Cette méthode est inspirée de la technique de GORNALL et al. (1949). On précipite les protéines des suspensions d'organites à l'aide de 2 ml d'acide trichloracétique à 10% (pour 1 ml de suspension). On centrifuge ensuite à 10.000 g pendant 10 mn. Le culot obtenu est remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée ; le culot est agité dans 0,2 ml de cholate de sodium à 4% , puis on ajoute successivement 3 ml de soude à 10% et 0,3 ml de sulfate de cuivre à 1%. La densité optique est mesurée à 540 nm. La gamme étalon est faite à l'aide d'une solution de sérum albumine de Boeuf de 1 à 5 mg/ml. Nous prenons soin de retrancher des résultats des dosages les quantités de sérum albumine introduites dans les milieux de broyage.

M - EXPRESSION DES RESULTATS.

Lorsque l'on compare des phénomènes physiologiques dans les tissus frais ou bien après maintien en survie, une difficulté vient de l'entrée

importante d'eau qui s'observe dans les disques en survie, entraînant une augmentation de plus de 20% du poids initial de matière fraîche. Il est donc impossible de comparer directement des résultats de dosages obtenus avec des tranches fraîches ou des tranches en survie en les exprimant par rapport au poids frais réel. Nous avons tourné cette difficulté de deux façons différentes :

- l'une consiste à exprimer les résultats par rapport au poids de matière fraîche initiale, en comparant des lots initialement identiques de tissu traités ou non traités.

- l'autre consiste à rapporter les résultats obtenus au nombre de rondelles, ce qui donne des indications valables puisque très souvent les expériences sont réalisées sur 50 g ou 100 g de matière fraîche (environ 150 rondelles); on part de 20 tubercules (dont le poids total est de 900 g environ) et on prend soin de brasser soigneusement les rondelles dans l'eau glacée avant de les répartir en deux lots identiques dont l'un est utilisé immédiatement, et l'autre est placé en survie.

II - REMANIEMENTS CYTOLOGIQUES

AU COURS DE LA SURVIE

Dans ce chapitre, nous nous proposons de suivre les modifications morphologiques provoquées à l'intérieur des cellules par la survie.

A - OBSERVATIONS PRELIMINAIRES.

1) Aspect macroscopique.

Les tranches de tissu, fraîchement coupées, sont le plus souvent de couleur jaune ; après 24 heures de survie cette couleur s'atténue un peu et vire à l'ocre jaunâtre. Nous n'avons jamais observé de brunissement des rondelles maintenues 24 heures en survie selon les techniques précédemment décrites ; c'est uniquement lorsque les rondelles sont maintenues en boîte de Pétri qu'un brunissement localisé dans la partie superficielle apparaît après 48 heures de survie (ce temps de survie a été rarement étudié). La survie entraîne une importante entrée d'eau dans les tissus, qui se traduit d'une part par une augmentation du poids de matière fraîche (par rapport au poids de matière fraîche initiale) et d'autre part, par un état de turgescence des cellules. Cette entrée d'eau provoque une augmentation de la taille des disques : le diamètre des disques s'accroît de 13 à 15 mm après 24 heures de survie. D'autre part leur épaisseur augmente de 2 à 2,1 mm.

2) Examens en microscopie optique.

Ces observations sont indispensables pour connaître les dommages éventuels qu'entraîne le maintien en survie sur les couches superficielles, pour rechercher si des formations cambiales, signalées par certains auteurs, après plusieurs jours de survie (LANGE, 1970), sont présentes après 24 heures de survie, et d'autre part pour tenter de suivre les remaniements subis par les constituants amylacés.

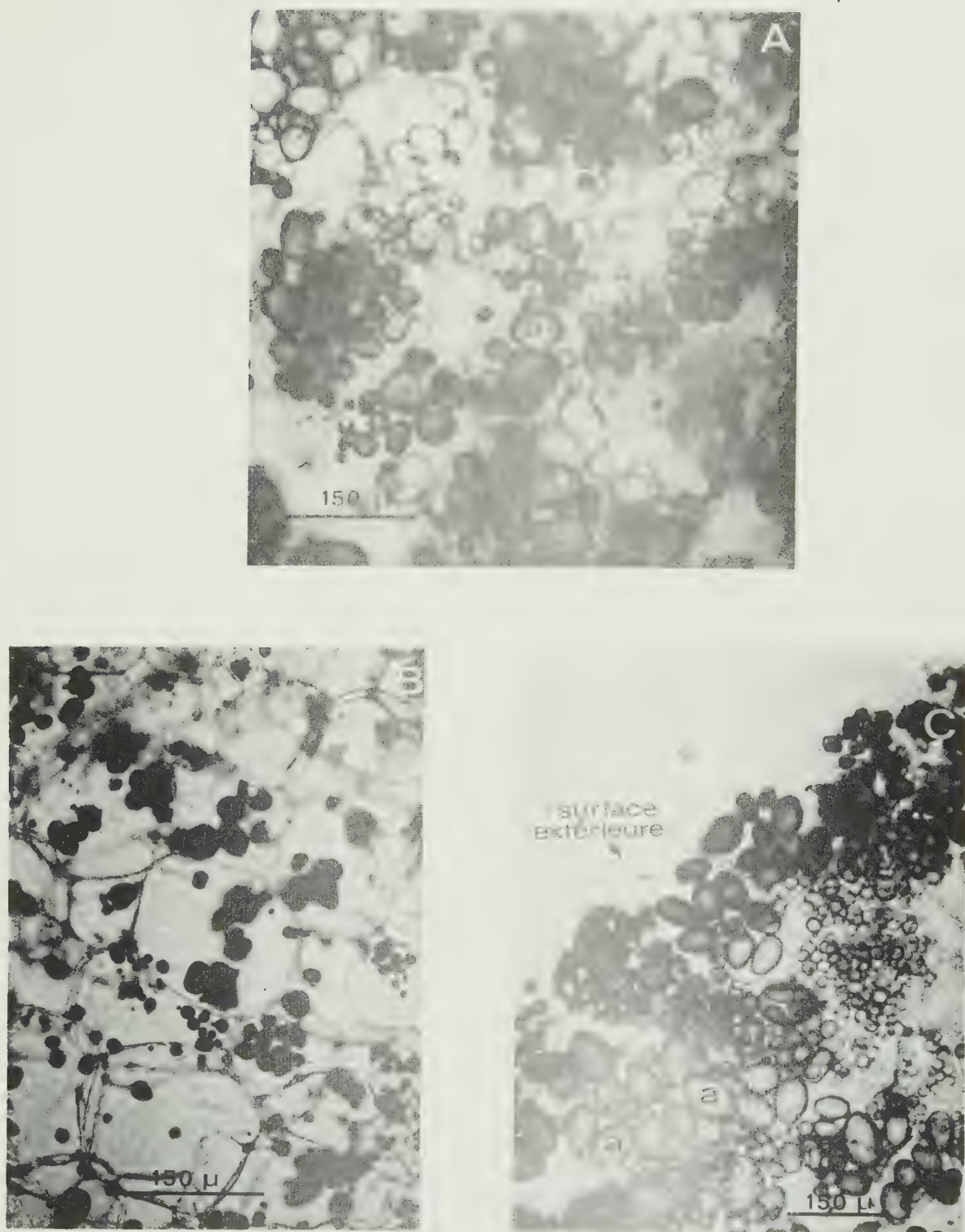


Fig. 4. Examens en microscopie optique de tranches de tubercules de Pomme de terre fraîchement coupées (A) ou maintenues en survie (B et C), après coloration au lugol. On observe une certaine raréfaction des grains d'amidon (a) après survie (B) et une apparition de jeunes plantes (pp).

Les coupes, faites à main levée à l'aide d'un microtome, sont simplement plongées dans le réactif de Lugol et examinées entre lame et lamelle au microscope optique ; on a également examiné les coupes semi-fines réalisées à l'ultramicrotome et incluses dans la paraffine.

Les coupes obtenues dans les tranches en survie ne montrent pas en surface de couches de subérine. Ceci est en bon accord avec STEWARD et al. (1932) et LANGE (1970) et confirme que l'apparition de formation cicatricielles nécessite plus de 24 heures (5 jours, selon LANGE) . D'autre part, nous n'avons jamais observé de cambium après 24 heures de survie. Ceci s'accorde aussi avec les résultats de STEWARD et al. (1932) et LANGE (1970), LANGE et al. (1970), ROSENSTOCK (1963) ; selon ces auteurs, également, plusieurs jours sont nécessaires pour avoir de telles formations, dans des conditions particulières.

Une observation intéressante concerne les inclusions amylacées dans les tranches de tissu ; en comparant les tranches fraîches et en survie, on recueille l'impression générale que le nombre de grains d'amidon diminue nettement dans les tranches en survie, tout en restant important (*Fig. 4*). Ce phénomène avait été déjà signalé par STEWARD et al. (1932) . PRIESTLEY et WOFFENDEN (1923), HOPKINS (1927) ont mesuré l'importance de ce changement en dosant l'amidon . Une autre transformation cytologique est visible : il s'agit de l'apparition en grand nombre de petites vésicules colorées en bleu-violacé par le réactif de Lugol, ce qui montre la présence d'amidon dans ces vésicules ; cependant, même à fort grossissement, on ne distingue pas les stries concentriques des grains d'amidon différenciés ; d'autre part, la taille de ces vésicules (3 à 6 μ) est inférieure à celles des grains d'amidon (taille supérieure à 10 μ) . L'examen en microscopie électronique nous montrera que ces vésicules sont des amyloplastes peu différenciés (BEN ABDEL-KADER, 1971) . A notre connaissance, ce phénomène n'a pas été signalé auparavant.

Les examens en microscopie optique nous permettent d'apprécier le nombre de cellules dans le petit massif cellulaire que constitue une rondelle de tubercule. Prenons, par exemple, une rondelle de 13 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur ; 2 mm représentent en moyenne 12 couches de cellules (résultat moyen de 20 comptages à la loupe binoculaire), ce qui indique une dimension d'environ 150 à 160 μ pour une cellule de parenchyme (résultat en accord avec les données de ARTSCHWAGER (1924) (1927) et STEWARD et al. (1932) ; 13 mm de diamètre représentent environ 78 couches

de cellules. Un calcul simple indique que dans cette rondelle de tissu sont présentes environ 60.000 cellules.

Les observations en microscopie optique nous ont donc montré que les cellules de tranches maintenues 24 heures en survie dans nos conditions d'expériences ne présentaient pas de remaniements morphologiques importants visibles à l'échelle de l'observation. Aucune formation cambiale n'est notée, ce qui suggère qu'aucune division cellulaire n'est achevée dans les 24 heures de survie. Enfin, des modifications importantes de la population plastidiale sont notées. Les examens en microscopie électronique vont nous révéler d'autres phénomènes touchant l'ultrastructure des cellules.

B - EXAMENS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

=====

Les observations en microscopie électronique, effectuées systématiquement sur des tranches fraîches et sur des tranches en survie, ont donné des résultats parfaitement reproductibles, retrouvés sur un grand nombre de lots différents, étudiés selon diverses techniques de fixation et d'inclusion.

Nous examinerons successivement les modifications ultrastructurales touchant les populations ribosomales du cytoplasme, les structures du réticulum endoplasmique, les structures dictyosomales, les populations mitochondriales, peroxysomales et plastidiales, ainsi que diverses transformations touchant la membrane cytoplasmique.

1) Populations ribosomales

La figure 5A présente une région cytoplasmique périnucléaire d'une cellule de tranche de tubercule fraîchement coupée. Le cytoplasme est peu dense, pauvre en structures organisées ; on distingue les ribosomes libres peu nombreux, disséminés dans le cytoplasme. Cet aspect du cytoplasme est couramment observé dans les tranches fraîches.

Par contre, les mêmes zones cytoplasmiques, mais examinées dans des cellules de tranches de tubercules maintenues en survie depuis 24 heures, (*Fig. 5B*) sont beaucoup plus denses et présentent de nombreux ribosomes

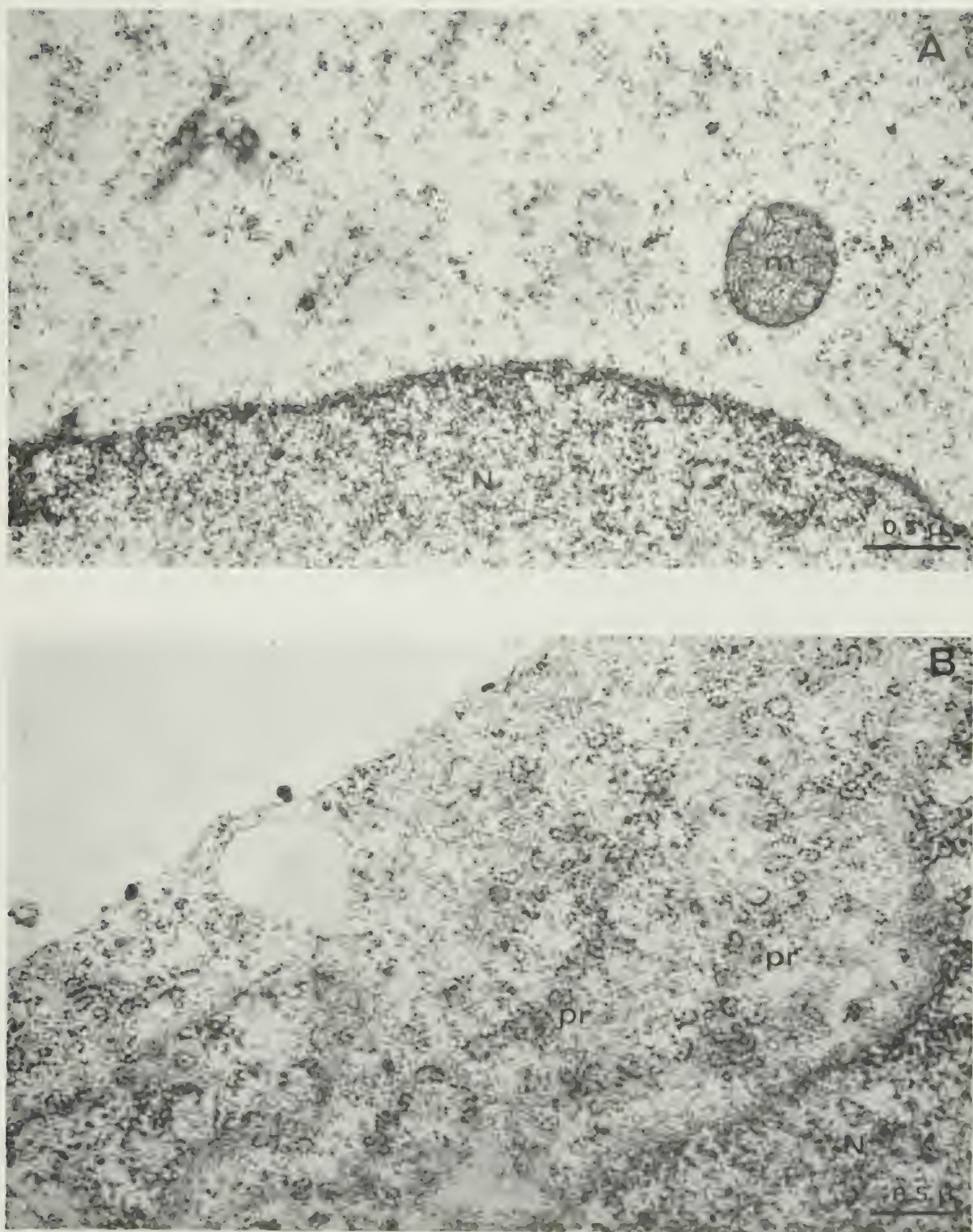


Fig. 5. Zones cytoplasmiques périnucléaires de cellule de tranche fraîche (A) ou maintenue en survie (B).
On distingue le noyau (N), une mitochondrie (m) et des ribosomes libres (r) ou associés en polyribosomes (pr).

associés en polyribosomes ; ces polyribosomes donnent des images caractéristiques, en chaînette, en rosette, en spirale, ou en hélice (*Fig. 6A*). Ces structures sont très nombreuses autour du noyau. La coupe étant tangentielle à la surface nucléaire, on aperçoit les pores nucléaires dominant le contour tourmenté de la membrane nucléaire qui, en raison de l'angle de coupe, ne présente pas la structure de double membrane (il est intéressant de noter que, dans plusieurs cas, le diamètre des rosettes polyribosomales est à peu près équivalent à celui des pores nucléaires). On devine aussi, dans la micrographie, que les polyribosomes semblent associés aux profils du réticulum endoplasmique sous-jacents, qui apparaissent comme des zones plus sombres. Nous retrouverons cette association dans d'autres micrographies (BEN ABDELKADER et AUDERSET, 1972).

De nombreux travaux, essentiellement réalisés sur les micro-organismes, ont permis de connaître la structure fine des polyribosomes. Les ribosomes seraient associés entre eux par l'intermédiaire d'une chaîne d'ARN messager ; la lecture du message génétique et sa traduction en chaîne polypeptidique s'effectueraient dans les deux sous-unités ribosomales, caractérisées par leur coefficient de sédimentation (50 s et 30 s pour les bactéries ; 60 s et 40 s pour les ribosomes cytoplasmiques des animaux et des végétaux). En effet dans nos micrographies, une petite constriction existe dans le corps de certains ribosomes, isolant deux parties inégales, pouvant correspondre aux deux sous-unités ribosomales.

Sur une autre micrographie, on peut noter (*Fig. 6B*) que le nucléole est très volumineux. La surface de ce nucléole est tourmentée et la zone superficielle est granulaire, alors que la partie centrale est plus compacte.

DISCUSSION

La présence de polyribosomes, dans une cellule vivante, est reliée classiquement à une activité de synthèse protéique très intense. Par exemple la présence des polyribosomes a été signalée dans les cellules hépatiques ou les érythrocytes de Rat (HARDESTY et al., 1963 a et b), les réticulocytes de Lapin (WARNER et al., 1962) (BERNHARD et al., 1954) (PALADE, 1953), l'oeuf d'Oursin fécondé (HULTIN, 1961), la cellule Hela (GOODMAN et RICH, 1963), le foetus de Rat (BEHNKE, 1965), *Escherichia Coli* (HUXLEY et ZUBAY, 1960), la levure (KOEHLER, 1962). Une observation pouvant être rapprochée

de nos résultats concerne la conversion de ribosomes libres en polyribosomes qui s'opère quand des cellules cancéreuses de Souris S 180 cultivées dans des milieux carencés en éléments nutritifs sont transférées sur un milieu riche en glucose (SE YONG LEE et al., 1971).

Il est à présent admis que les polyribosomes sont les formations cellulaires où s'effectue la synthèse protéique ; dans les ribosomes libres, cette synthèse serait faible ou inexistante : cette affirmation repose sur de nombreux travaux réalisés *in vitro* ou *in vivo* (WATSON, 1963 ; RICH et al., 1963 ; WARNER et al., 1963 ; GOODMAN et RICH, 1963 ; DE MAN et NOORDYUN, 1969).

La présence de polyribosomes dans des micrographies électroniques de cellules végétales a été rarement signalée ; on peut citer la graine de Radis en imbibition (JULIEN, 1971), le méristème caulinaire de l'Epinard (AUDERSET, 1972), les pointes de racines de Soja (LIN et al., 1966), des cellules cambiales d'*Acer pseudo-platanus* (CATESSON, communication personnelle) ; on peut remarquer qu'à tous ces tissus, on peut associer une intense activité métabolique. A l'aide de fractionnements sur colonne de Sephadex, les biochimistes ont pu mettre indirectement en évidence des polyribosomes (par l'ARN de très haut poids moléculaire apparent) dans des graines de Coton (WATERS et DURE, 1966), de Radis (JULIEN, 1971) ou de Ricin (MARRÉ et al., 1965) après quelques heures d'imbibition. Au contraire, la conversion inverse des polyribosomes en ribosomes libres est un des signes de la sénescence ; ainsi SRIVASTAVA et ARGLEBE (1967) montrent que dans des feuilles d'Orge excisées et laissées dans l'eau pendant quelques heures, on observe une diminution du nombre de polyribosomes, avec apparition de ribosomes libres. Conformément à ce que nous avons dit plus haut, ce qui se déroule dans les cellules de Pomme de terre en survie n'a donc apparemment rien à voir avec la sénescence. Cette apparition de polyribosomes pendant la survie a été retrouvée sur le Topinambour par ROSE et SETTERFIELD (1971), confirmant les premières observations de FOWKE et SETTERFIELD (1968). D'autre part, les techniques biochimiques d'ultracentrifugation en gradient de densité ont permis à LEAVER et KEY (1966) et à CHERRY (1968) de mettre en évidence le premier phénomène respectivement dans des tranches de Carotte ou de Betterave en survie. Ces mêmes techniques ont récemment permis à KAHL (1971a) de confirmer la conversion de ribosomes en polyribosomes dans les disques de tubercule de Pomme de terre en survie ; la proportion maximum de polyribosomes par rapport aux ribosomes totaux serait atteinte en 24 heures ; une synthèse

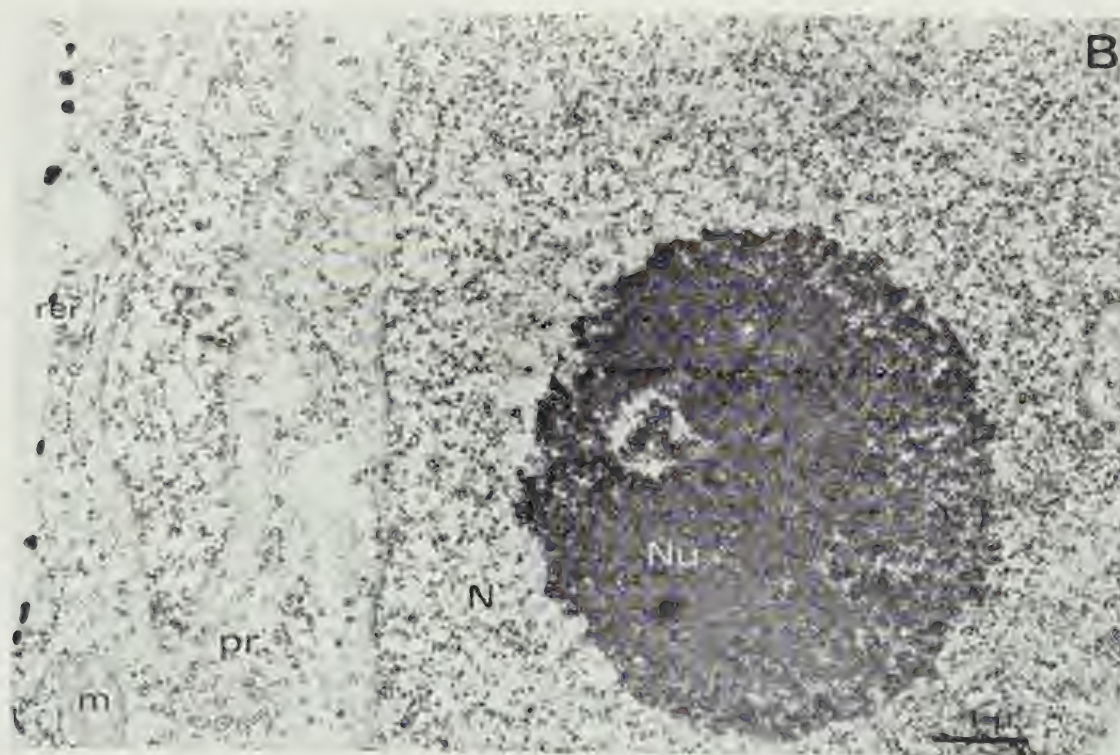
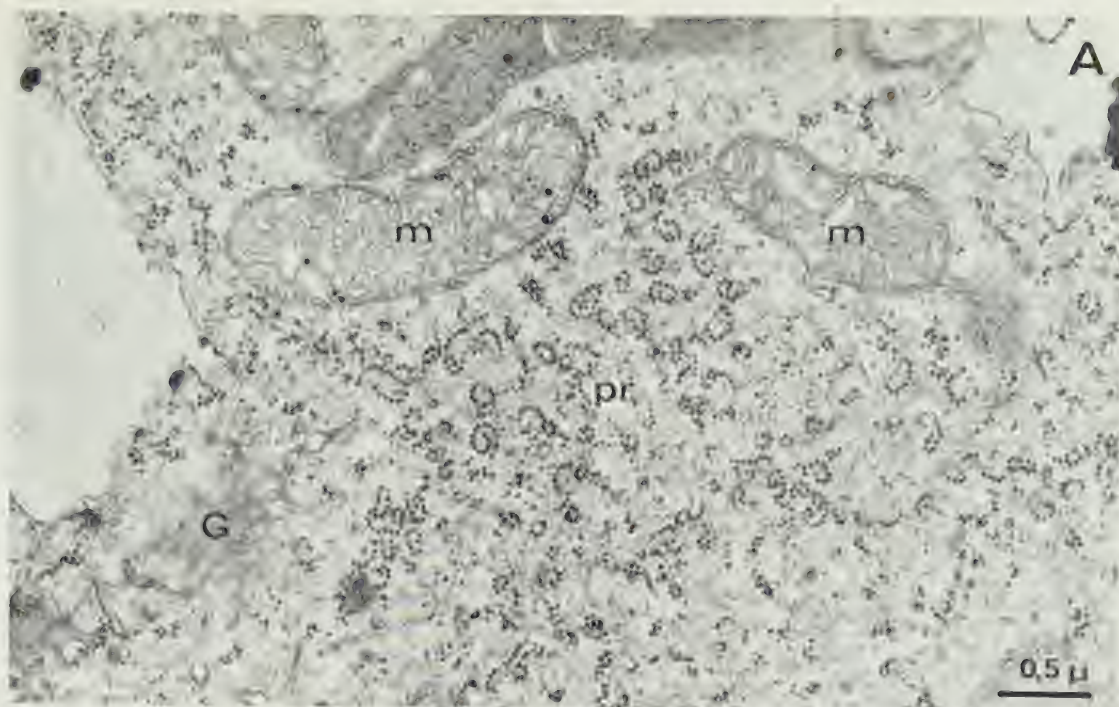


Fig. 6. Zones cytoplasmiques de cellules de tranches préalablement maintenues en survie (A et B).
On remarquera le grand nombre de polyribosomes (pr) (A et B) et la grande taille du nucléole (Nu) (B).
G = appareil de Golgi.

d'ARN ribosomal et d'ARN de transfert est signalée. En accord avec les observations de LEAVER et KEY (1966), l'auteur suggère que pendant la survie il se réalise peut-être une synthèse de nouveaux ribosomes, mais surtout une association de ribosomes préexistants entre eux.

Nos observations morphologiques sont donc en plein accord avec ces récentes analyses biochimiques et suggèrent fortement une dérégulation des systèmes de synthèse des protéines au cours de la survie, permettant l'expression de potentialités génétiques jusque-là cachées. Une indication supplémentaire est la grande dimension du nucléole des cellules en survie ; il est vraisemblable que le nucléole est le siège de la synthèse d'ARN ribosomal (BIRNSTIEL et al., 1963) ; cet organite est particulièrement volumineux dans les cellules en division (LAFONTAINE et LORD, 1969).

2) Réticulum endoplasmique.

La figure 7A présente un aspect du cytoplasme très rarement rencontré dans les cellules de tranches fraîches. Nous avons en effet choisi pour cette figure une des zones cytoplasmiques les plus denses rencontrées dans ces cellules. Si l'on distingue des ribosomes libres en grand nombre, on ne peut cependant trouver que des profils du réticulum endoplasmique très peu développés.

Par contre, après 24 heures de survie (*Fig. 7B*), les profils du réticulum endoplasmique sont très abondants dans toutes les cellules des tranches de tubercule. Ces membranes du réticulum endoplasmique contiennent de nombreux ribosomes associés. Ainsi se confirme l'hypothèse que nous avons faite dans le paragraphe précédent et qui suggèrerait une association entre polyribosomes et le réticulum endoplasmique ; les structures classiques polyribosomales (en hélice ou en chaîne) ne sont pas retrouvées dans cette coupe transversale par rapport aux nappes du réticulum, mais, dès que la coupe passe tangentiellement à ces nappes, la structure polyribosomale s'observe. Cette association s'observe clairement dans les examens réalisés *in vitro* (cf. 3ème partie).

Ce développement des membranes du réticulum endoplasmique est un des événements morphologiques les plus spectaculaires qui se produisent après survie. Ce phénomène a été observé dans un grand nombre d'expériences.

On note aussi que certains profils du réticulum endoplasmique se

terminent par une extrémité arrondie, dépourvue de ribosomes, accompagnée d'un élargissement de la lumière cisternale. On peut penser qu'il s'agit de formes de transition donnant le réticulum endoplasmique lisse.

DISCUSSION

La présence abondante de membranes du réticulum endoplasmique portant des ribosomes associés en polyribosomes est une indication supplémentaire d'une importante activité de protéogénèse. D'après certains auteurs, la majorité de l'ARN ribosomal du cytoplasme des cellules animales est associée aux membranes du réticulum endoplasmique (BLOBEL et POTTER, 1967 ; SIEKEVITZ, 1963 ; PALADE et SIEKEVITZ, 1956 ; PALADE, 1953) ; l'association entre polyribosomes et membranes se ferait par l'intermédiaire des grandes sous-unités ribosomales (ATTARDI et al., 1969 ; SABATINI et al., 1966).

D'après d'autres travaux, il semble que l'attachement des ribosomes aux membranes du réticulum endoplasmique soit un phénomène indépendant de la formation des polyribosomes ; l'attachement aux membranes succéderait normalement à l'association des ribosomes (WHALEY et al., 1960) ; on assisterait au cours de la vie de la cellule à la succession de ces deux événements. Dans les cellules des tissus en survie, où le phénomène est déclenché par l'expérimentateur, on peut assister aux différentes étapes.

Dans une cellule normale, les structures du réticulum endoplasmique varient beaucoup selon l'état physiologique de la cellule ; ainsi, les structures sont peu développées dans les cellules adultes ; par contre, dans les cellules en différenciation, on rencontre fréquemment ces structures ; ce lien entre le degré de différenciation de la cellule et le développement du réticulum endoplasmique est observé aussi bien dans la cellule animale (MOULÉ, 1964) que dans la cellule végétale (WHALEY et al., 1960). Le réseau membranaire est surtout important dans les cellules au moment où s'élabore du matériel cellulaire nouveau ; en effet on associe au réticulum endoplasmique des rôles essentiels dans la biosynthèse des protéines (grâce aux ribosomes qui y sont associés), dans la biosynthèse des lipides, dans le transport de ces substances en tous points de la cellule. Par contre la sénescence des organes est accompagnée d'une disparition progressive du réticulum endoplasmique : ce fait a été étudié dans les feuilles excisées et laissées en

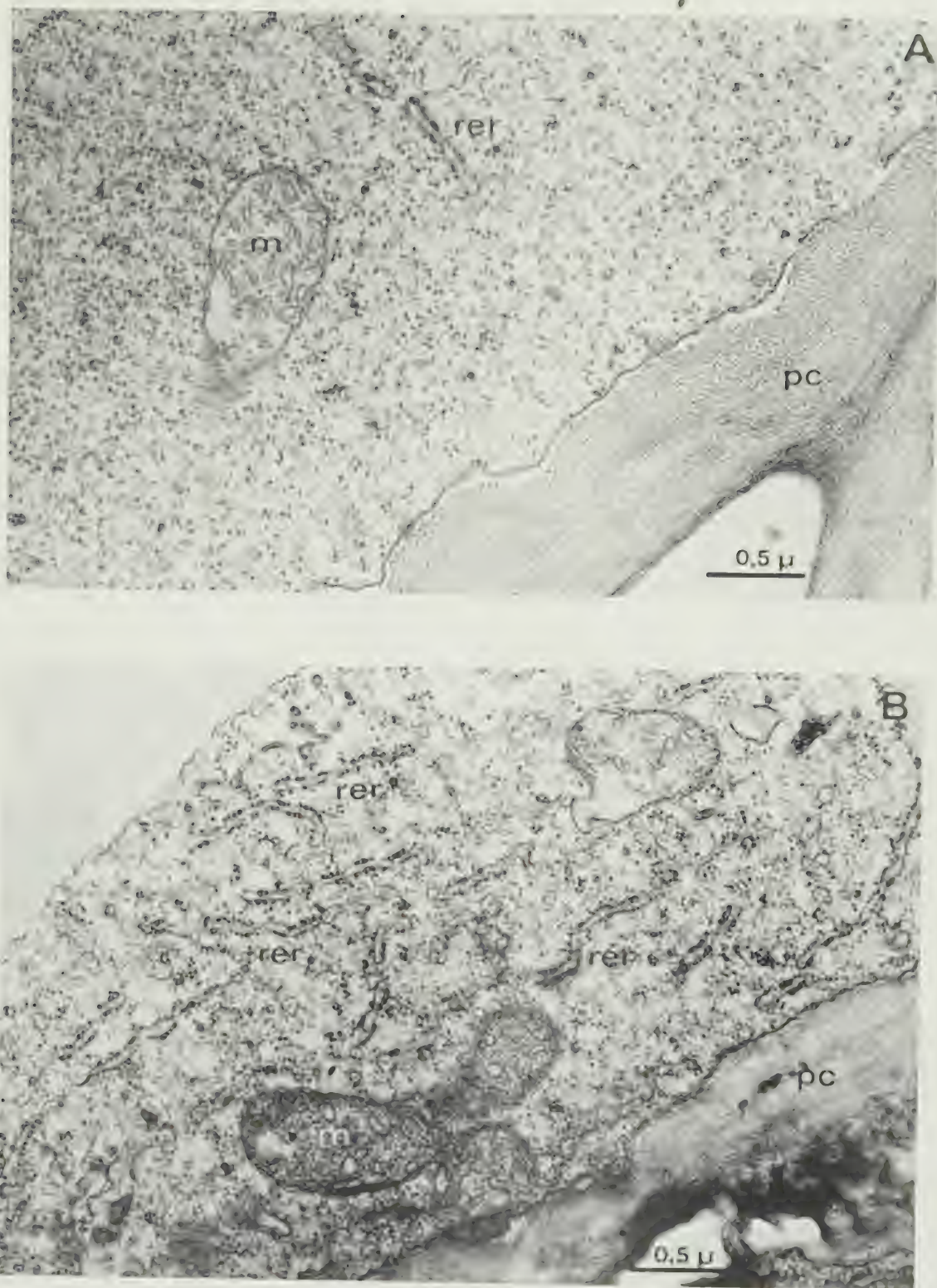


Fig. 7. Zones cytoplasmiques de cellules de tranches fraîches (A) ou après survie (B). On remarque le grand nombre de profils du réticulum endoplasmique portant des ribosomes dans les cellules en survie (rer) (B).
 pc = paroi pectocellulosique.

survie dans de l'eau distillée (SHAW et MANOCHA, 1965).

Une étude de DALLNER et al. (1966 a et b) a précisé l'évolution du réticulum endoplasmique dans le fœtus de Rat et dans le Rat nouveau-né ; ces auteurs ont montré qu'un développement important des membranes du réticulum endoplasmique portant des ribosomes précédait l'apparition de réticulum endoplasmique lisse ; pendant que se développe le réticulum endoplasmique granulaire, de nombreuses activités enzymatiques sont induites. Les analogies entre cet ensemble de phénomènes et les événements provoqués par la survie des disques de tubercule de Pomme de terre sont nombreuses ; nous y reviendrons par la suite.

La survie de tranches de tubercule de Topinambour (FOWKE et SETTERFIELD, 1968) (ROSE et SETTERFIELD, 1971) provoque aussi un développement appréciable des profils des membranes du réticulum endoplasmique. Par contre la survie de disques de Betterave semble s'accompagner dans les premières heures d'une dégradation des membranes du réticulum endoplasmique, puis un faible développement survient après 96 heures. (JACKMAN et VAN STEVENINCK, 1967) ; cette observation a longtemps laissé supposer que la survie de tous les tissus s'accompagnait d'une dégradation du réseau membranaire intracellulaire, ce qui est tout à fait inexact dans le cas du tubercule de Pomme de terre.

3) Appareil de Golgi.

Dans les cellules en survie apparaissent de nombreux dictyosomes ; ces formations ne sont pratiquement jamais rencontrées dans les tranches fraîchement coupées (*Fig. 8*). On note la structure classique des dictyosomes avec les saccules empilés (3, 4 ou 5 rangées) ; ces saccules émettent des vésicules golgiennes caractéristiques. Lorsque la coupe passe tangentiellement à la surface des saccules dictyosomales, on peut observer leur forme générale d'"assiette" à bords perforés.

DISCUSSION

La présence de l'appareil de Golgi dans les cellules en survie est une observation intéressante ; en effet on rencontre fréquemment ces

structures dans les cellules méristématiques en activité (FREY-WYSSLING et MUHLETHALER, 1965), (MOLLENHAUER et MORRE, 1966), (NOUGAREDE, 1963), (MORRE et al., 1971) ; d'autre part, le nombre des dictyosomes augmente de plus de 100 fois dans des cellules de racines de Maïs en croissance (MOLLENHAUER, 1965). Les dictyosomes sont très nombreux dans les grains de pollen de *Tradescantia* en développement (MARUYAMA, 1965) ou dans les oocytes de *Rana* en croissance (WARD et WARD, 1968). Par contre, dans les cellules au repos, les dictyosomes sont absents.

D'une façon générale, l'appareil de Golgi est donc fréquemment présent dans les cellules à intense activité métabolique ; ceci s'explique par les nombreux rôles que l'on s'accorde de plus en plus à attribuer au système de Golgi. L'appareil de Golgi interviendrait dans l'élaboration et le transfert de grains de zymogène dans la cellule pancréatique (PALADE, 1956), la synthèse et le transfert des polysaccharides, la formation de la membrane pectocellulosique des cellules végétales (WHALEY et al., 1960), le remaniement et la distribution de constituants membranaires intracellulaires ("membrane flow") (SIEKEVITZ et PALADE, 1960 ; MORRE et al., 1971).

Il ressort incontestablement de toutes ces données que la présence des dictyosomes dans les tranches de tubercules en survie peut être considérée comme une indication de leur activité biogénétique intense.

4) Populations plastidiales.

Les examens en microscopie optique nous ont suggéré qu'il se produisait des modifications importantes dans la population plastidiale ; la microscopie électronique va confirmer ces observations.

La figure 9 montre un amyloplaste différencié contenant de l'amidon ; le grain d'amidon appuie fortement sur la membrane plastidiale et laisse ainsi une faible masse de stroma enveloppant. On distingue dans ce stroma de la phytoferritine, ainsi que des inclusions diverses (Fig. 9A). A côté de ces structures différenciées, on rencontre de très nombreux organites de plus petite taille à stroma très dense, contenant de la phytoferritine, des gouttelettes osmiophiles (Fig. 9B, 9C) ; une inclusion peu importante d'amidon se reconnaît dans certains de ces organites. La double membrane enveloppante est nettement dessinée ; d'autre part un réseau

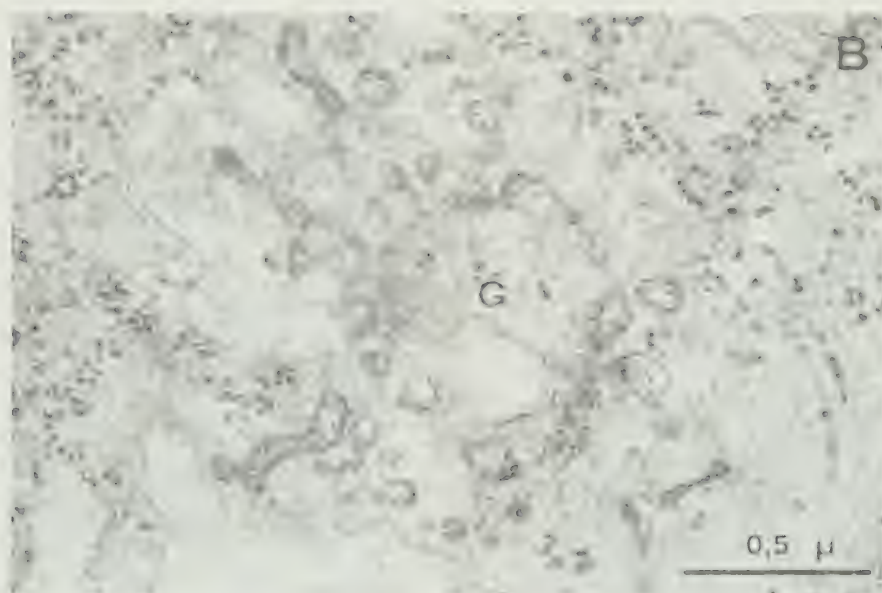
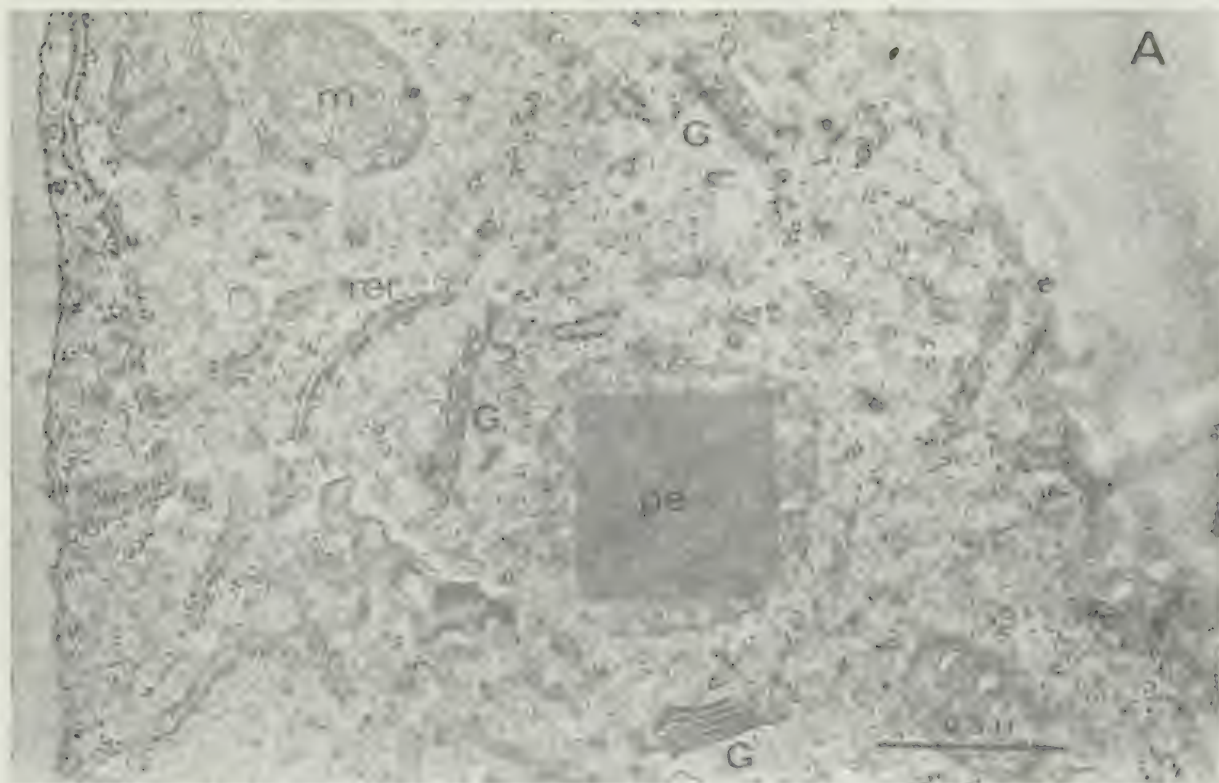


Fig. 8. Zones cytoplasmiques de cellules de tranches maintenues en survie. Les structures dictyosomales (G) sont nettement visibles en section transversale (A) ou longitudinale (B).
pe = peroxysome.

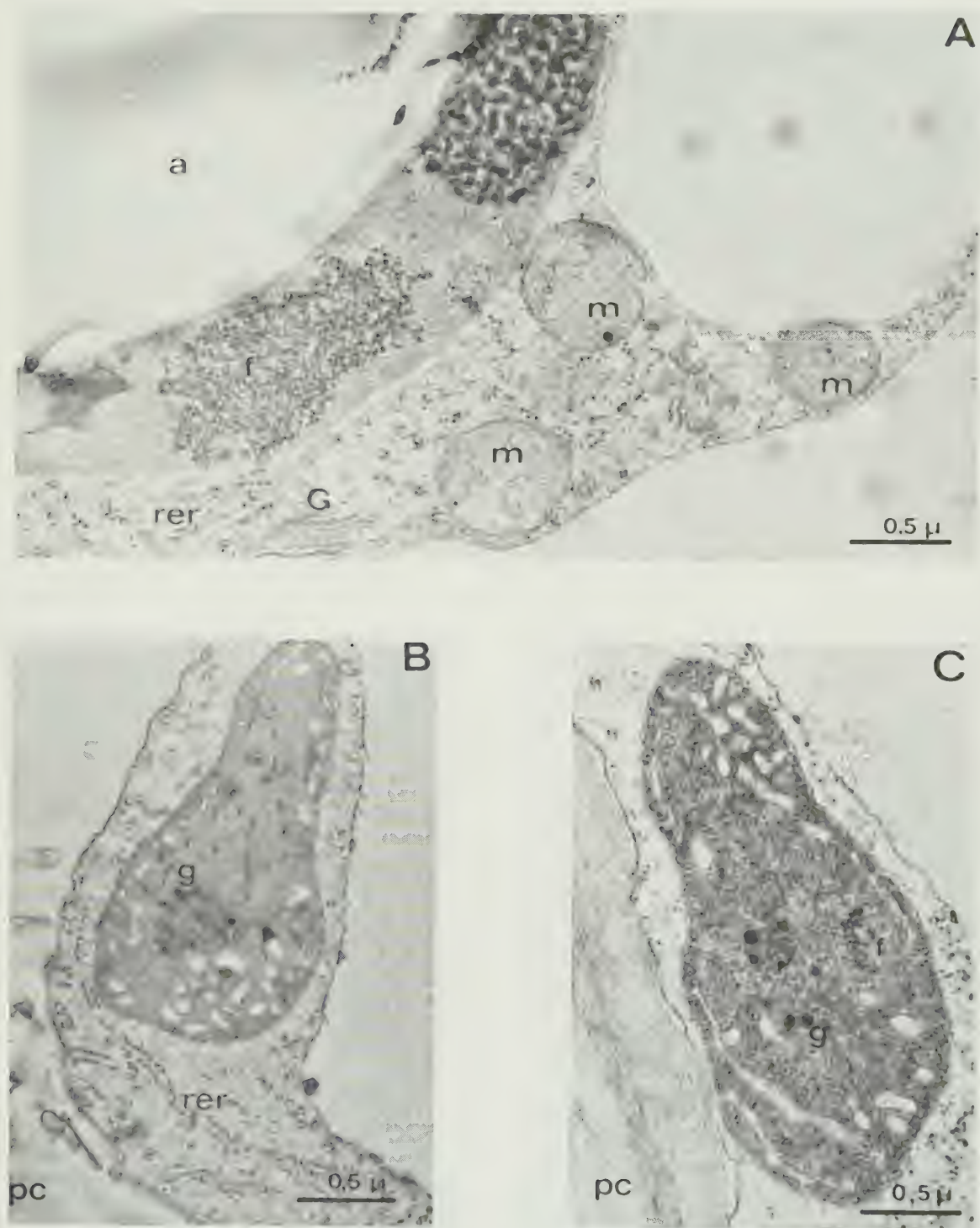


Fig. 9. Quelques aspects des populations plastidiales (p) présentes dans les cellules des tranches en survie.

A = fragment d'un amyloplaste différencié montrant l'inclusion d'amidon (a) et, dans le stroma enveloppant, une inclusion de phytoferritine (f).

B et C = plastes jeunes, à stroma dense (proplaste) contenant des inclusions de phytoferritine et des globules osmiophiles (g).

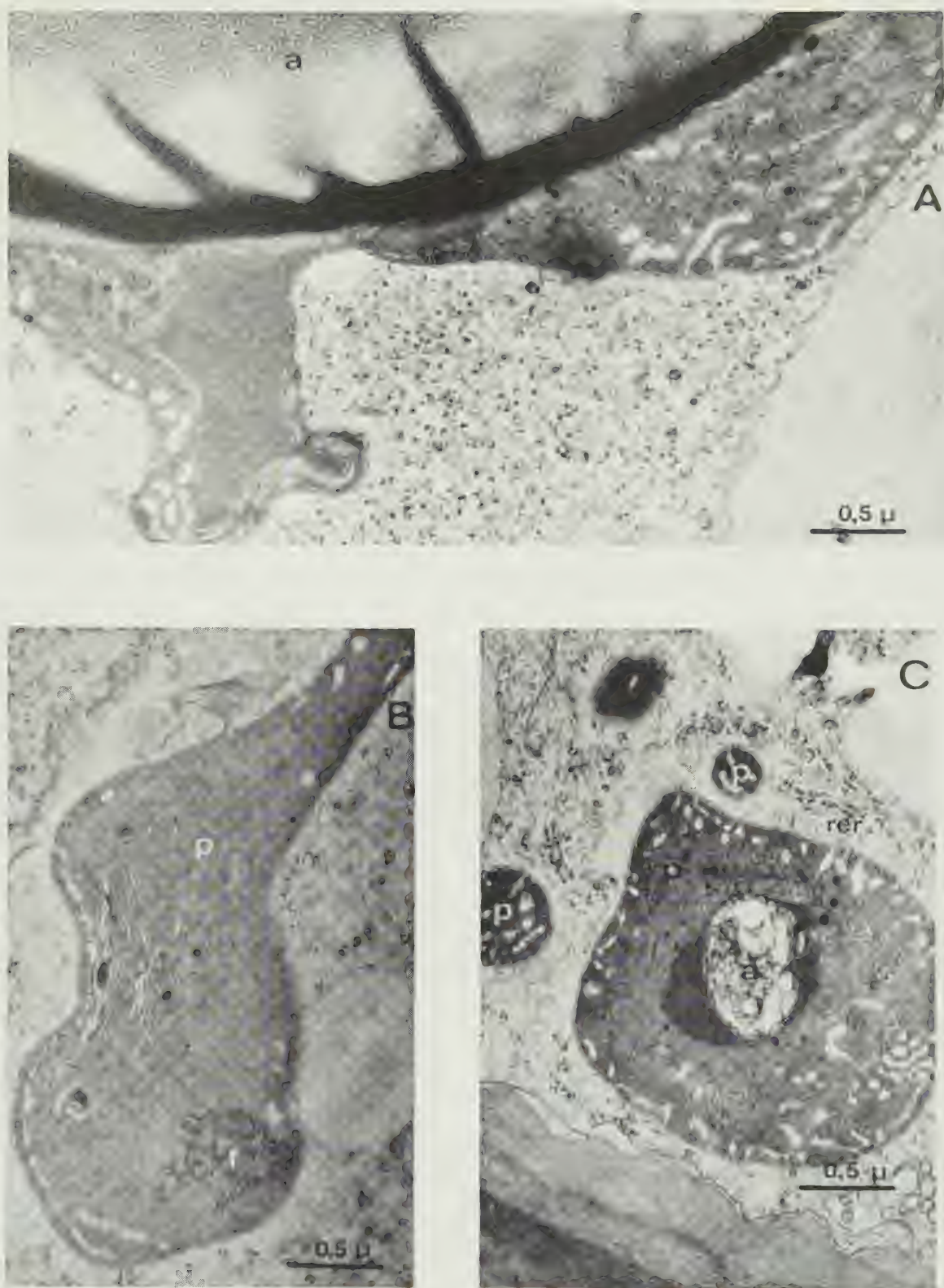


Fig. 10. Aspects des populations plastidiales présentes dans les tranches maintenues en survie montrant la grande variété des tailles des plastes. Une ontogénie des jeunes plastes par bourgeonnement des amyloplastes préexistants est suggérée par ces micrographies (en particulier, en A).

membranaire interne est facilement discernable, ainsi qu'un réseau périphérique membranaire. Ces observations nous permettent d'identifier ces organites, en nous référant aux indications de FREY-WYSSLING et MUHLETHALER (1965), comme des proplastes ou des jeunes amyloplastés peu différenciés.

Une hypothèse concernant l'origine probable de ces organites peut être formulée après examen d'images comme celles de la figure 10 ; dans certains amyloplastés, le stroma semble être étiré vers l'extérieur, un peu comme une pâte molle sur laquelle on tire ; on peut imaginer que les plastés jeunes seraient ainsi obtenus par bourgeonnement des amyloplastés préexistants. Deux observations sont en faveur de cette hypothèse, l'une est la présence de plastés de forme bourgeonnante caractéristique, l'autre est la coexistence dans une même cellule de plastés de toute taille allant d'une taille très petite ($1\ \mu$) à la taille importante ($10-15\ \mu$). Les populations plastidiales hétérogènes sont exclusivement rencontrées dans les cellules en survie. Les cellules des tranches fraîches ne contiennent que des amyloplastés bien différenciés.

DISCUSSION

La mise en évidence d'une population plastidiale nouvelle dans les tranches en survie est une observation originale qui est intéressante à plusieurs points de vue.

La présence de jeunes plastés ou de proplastés est souvent notée dans les cellules méristématiques (méristème radiculaire de Lentille (CAPORALLI, 1959) ou dans les cellules en croissance de plantes supérieures (STUBBE, 1971)). Il est classiquement admis que les proplastés peuvent se développer en leucoplastés, amyloplastés ou chloroplastés (KIRK et TILNEY-BASSETT, 1967). La voie inverse est plus rarement rencontrée ; un cas semblable est observé dans l'Euglène où, lorsque les cultures de cellules sont transférées de la lumière à l'obscurité, les chloroplastés se transforment en étioplastés (BENSHAUL et al., 1965 ; STUBBE, 1971) ; par contre ce phénomène est fréquent dans les organes végétaux en dédifférenciation. Les cellules en survie constituent donc un matériel très intéressant pour étudier l'ontogénie des jeunes plastés, à partir d'amyloplastés différenciés. D'autre part le sens dans lequel se produit cette ontogénie est intéressant puisque l'on part de structures chargées de réserves amylacées pour obtenir

des structures à matrix importante et moins riches en amidon. Nous évoquerons plus loin l'intérêt de cette plastidogénèse qui peut être retrouvée dans les cellules en croissance et indique un début de différenciation des cellules pendant la survie.

5) Mitochondries.

Contrastant avec les bouleversements importants observés dans les autres compartiments cellulaires, la population mitochondriale ne présente pas de modifications apparentes en cours de survie. On ne peut déceler dans les coupes de tissu de changements appréciables dans l'allure générale des mitochondries. Les conclusions que nous pouvons retirer de l'examen des organites *in situ* ne peuvent être que partielles, étant donné le nombre très réduit des mitochondries dans une cellule de parenchyme. Il faudrait effectuer un nombre considérable de coupes pour avoir des résultats significatifs. Une autre méthode consiste à rassembler les mitochondries *in vitro* en les retirant des cellules. Cette technique s'est révélée fructueuse.

Examens morphologiques *in vitro*.

Nous décrirons plus loin le résultat des examens des fractions mitochondriales purifiées ; nous voulons ici seulement présenter l'aspect morphologique de mitochondries isolées de tranches après survie et recueillies par centrifugation à vitesse faible (1500 g pendant 10 minutes - *Fig. 11*) (Les mitochondries sont habituellement obtenues en grandes quantités par centrifugation à 10.000 g pendant 15 minutes) ; dans le culot à 1500 g qui rassemble les organites lourds (jeunes plastes, peroxyosomes), on retrouve quelques mitochondries ; ces mitochondries lourdes ont deux caractéristiques importantes :

- elles présentent souvent une zone claire, peu dense aux électrons, qui renferme des filaments sombres qui pourraient représenter l'ADN mitochondrial (NASS et NASS, 1963 ; NASS, 1968 ; SCHATZ, 1970).

- d'autre part elles sont très souvent groupées par deux ; dans une image remarquable, on peut observer à l'intérieur d'une enveloppe continue deux masses nettement séparées ; la nature mitochondriale des organites est indiquée par la présence de crêtes caractéristiques.

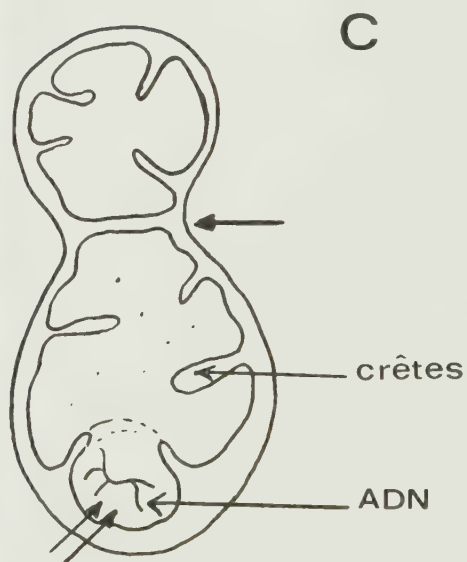
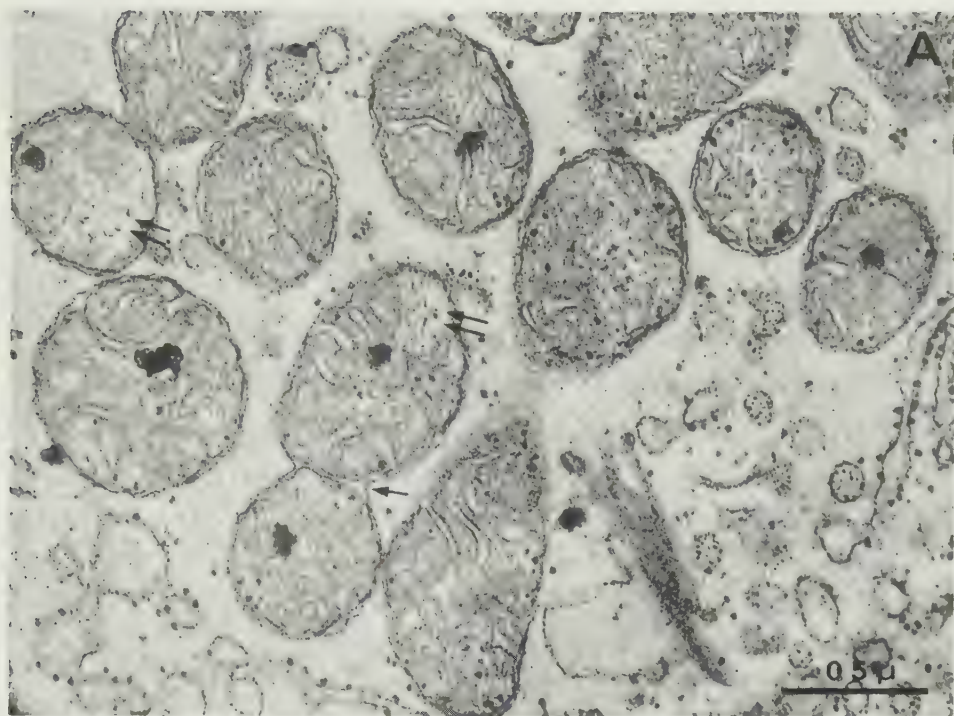


Fig. 11. Quelques aspects de mitochondries observés dans des culots rassemblant les "mitochondries lourdes" recueillies à 1.500 g/10mn à partir de tranches maintenues en survie (A et B). Certaines structures évoquent une division mitochondriale, schématisée en C (la flèche simple indique une constriction médiane dans le corps d'une mitochondrie). Les flèches doubles désignent des structures qui pourraient être de l'ADN mitochondrial.

Il peut donc s'agir d'une figure de division mitochondriale, qui commencerait par la scission en deux parties de la matrix interne mitochondriale ; une telle image ne peut être obtenue que dans le cas où la coupe passe exactement selon un angle favorable.

DISCUSSION

Si une apparente stabilité morphologique des mitochondries ressort de l'examen des tranches de tissu *in situ*, les observations *in vitro* révèlent que les structures mitochondriales se modifient quelque peu.

Un premier fait est la présence des structures que l'on peut supposer être des filaments d'ADN mitochondrial d'après les micrographies publiées par NASS (1968), SCHATZ (1970) ; d'après ces auteurs, l'ADN mitochondrial serait surtout visible dans les mitochondries des cellules en activité métabolique intense : cellules de racines de Maïs en élongation (CHRISPEELS et al., 1966), levures cultivées en aérobiose (SCHATZ, 1970).

La deuxième observation intéressante est l'existence de ces images présentant une constriction nette. Certes LEE et CHASSON (1966b), VERLEUR (1969) ont publié des images montrant des mitochondries fortement étirées en leur partie médiane ; ces images suggèrent une division des mitochondries, mais ne sont pas totalement concluantes puisqu'elles peuvent être dues à une torsion dans l'espace du corps mitochondrial. Cette critique ne peut être émise à propos des images que nous avons décrites dans nos expériences, puisqu'elles indiquent une division des masses internes mitochondriales. Cependant on ne peut écarter entièrement l'hypothèse d'une fusion de mitochondries préalablement séparées.

Des images suggérant une division mitochondriale ont été observées par LAFONTAINE et LORD (1969) dans des cellules hépatiques de Rat ou par LARSEN (1970) dans des cellules de *Calpodes ethlius*, pendant le passage des larves à l'état adulte ; dans ce dernier exemple, l'auteur note pendant les 20 premières heures une augmentation du diamètre des mitochondries, puis à partir de la 30 ème heure, un accroissement important du nombre des mitochondries. Parallèlement, l'auteur observe de nombreuses figures de division mitochondriale. L'analogie entre ces phénomènes et ceux que nous observons dans les cellules en survie est remarquable.

Signalons enfin qu'ASAHI et al. (1966), VERLEUR et URITANI (1965)

travaillant sur les disques de patate douce et NAKANO et ASAHI (1970) sur des disques de Pomme de terre, ont déterminé le nombre des mitochondries contenues dans des culots isolés après survie de ces tissus ; l'augmentation du nombre des mitochondries (mesurée par microscopie optique) est de 12% (ASAHI et al., 1966) ou de 45 à 58% (NAKANO et ASAHI, 1970) en 24 heures. Malgré les incertitudes méthodologiques (action faiblement sélective du vert Janus, risque très important de compter les jeunes plastes), ces observations vont dans le sens d'une faible mitochondriogénèse.

6) Peroxisomes.

Dans de nombreuses micrographies sont présents des organites à une seule membrane, contenant des cristaux pouvant avoir des formes diverses, carrées ou triangulaires (*Fig. 8A*) ; ces organites sont présents aussi bien dans les cellules fraîches que dans les cellules en survie. Par comparaison avec les documents photographiques présentés dans la littérature (DE DUVE et BAUDHUIN, 1966 ; BAUDHUIN, 1969 ; CATESSON, 1970), on peut supposer que ce sont des peroxysomes. Une indication supplémentaire est apportée par RUIS (1971) qui vient d'isoler récemment des tranches de tubercule de Pomme de terre en survie une fraction enrichie en ces structures et qui possède des activités catalasiques importantes.

7) Membrane cytoplasmique.

D'une façon générale, la membrane cytoplasmique présente une structure plus tourmentée dans les cellules en survie. D'autre part, dans certaines observations (*Fig. 12*), on peut noter le début de la formation de la plaque équatoriale entre deux cellules, images analogues à celles obtenues par WHALEY et al., 1971, HEPLER et NEWCOMB, 1967). Ceci confirme que la plupart des événements qui se produisent pendant la survie préparent des divisions cellulaires qui s'amorcent à peine après 24 heures de survie.

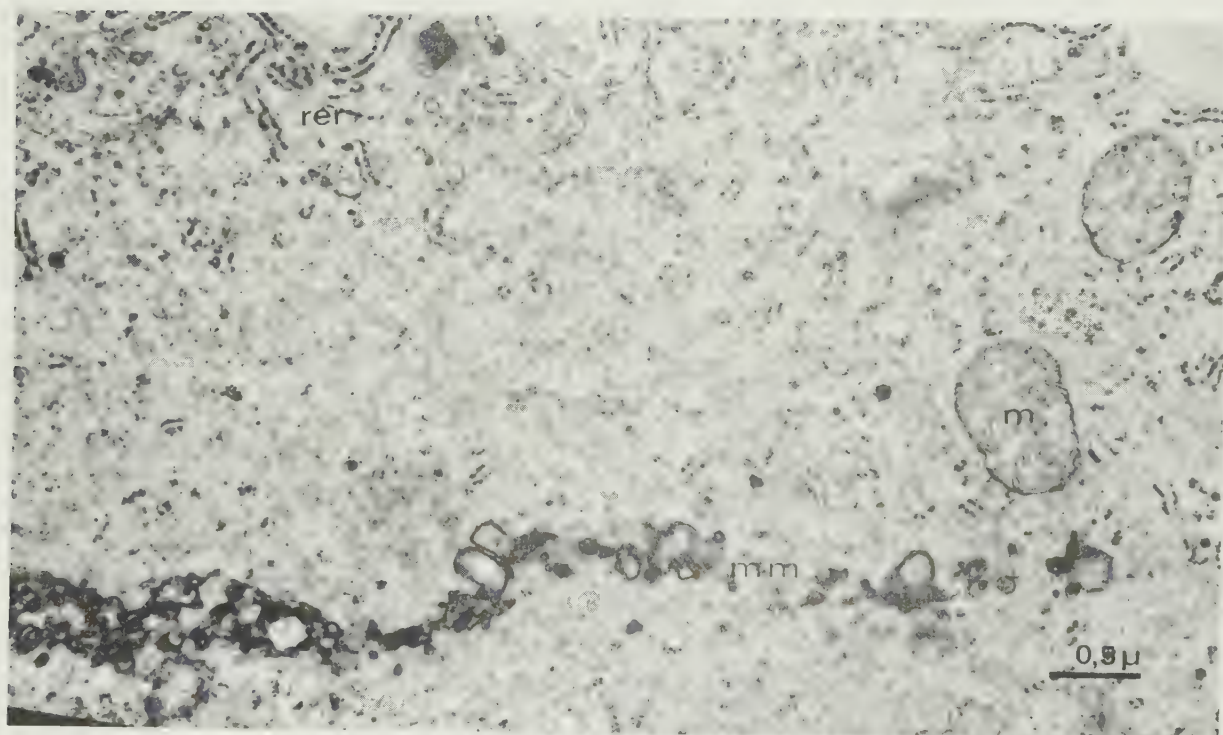


Fig. 12. Micrographie d'une zone cytoplasmique de cellule de tranche en survie montrant une association de vésicules, probablement d'origine dictyosomale, qui vont donner une membrane cytoplasmique nouvelle (mm).

C - CONCLUSIONS GENERALES DES RECHERCHES CYTOLOGIQUES.

On peut d'abord supposer que toutes les modifications de l'ultrastructure des cellules ne sont qu'une conséquence de l'effet mécanique provoqué par la blessure. Les travaux de WHALEY et al., (1964) ont clairement montré que lorsque les extrémités de racines de Maïs sont sectionnées, en 15 secondes apparaissent des changements ultrastructuraux importants dans les cellules les plus proches de la surface blessée : prolifération de l'enveloppe nucléaire, début de vésiculation du réticulum endoplasmique, diminution du nombre des vésicules golgiennes. Le rapprochement que l'on peut faire entre ces événements et les phénomènes observés au cours de la survie est cependant peu évident, et nous pouvons écarter cette interprétation en nous basant sur les faits suivants :

- les tranches fraîches sont toujours fixées plus de 15 secondes après le prélèvement.
- les modifications observées au cours de la survie sont beaucoup plus profondes que les modifications immédiates dues au traumatisme et impliquent une transformation fondamentale de l'ultrastructure cellulaire.

Par ailleurs, la comparaison systématique des infrastructures dans les cellules fraîches et les cellules maintenues en survie doit être soumise à une critique d'ordre méthodologique. Il n'est pas impossible, en effet, que la fixation du tissu frais soit plus délicate à réaliser que la fixation du tissu en survie ce qui pourrait ainsi entraîner une certaine dégradation des structures dans les cellules fraîches. On peut répondre à cette critique en remarquant que la structure mitochondriale, par exemple, est bien conservée dans les cellules fraîches. Cette critique illustre cependant la nécessité de recourir à des techniques complémentaires (biochimiques) pour confirmer les conclusions de l'analyse morphologique.

Les études cytologiques ont néanmoins donné de nombreux résultats dont le plus important est la mise en évidence d'une *formation intense de membranes pendant la survie*. Parmi tous les remaniements cytologiques observés dans les cellules en survie, on peut distinguer :

- a) des signes de reprise de l'activité métabolique des cellules, comprenant :
 - l'accroissement du volume du nucléole, qui est probablement le lieu de synthèse des précurseurs des ARN ribosomiaux

- la présence de polyribosomes, siège de la synthèse protéique
 - l'association de ces polyribosomes aux membranes du réticulum endoplasmique.
- b) une formation de nouvelles membranes intracytoplasmiques impliquant :
- un développement important des profils du réticulum endoplasmique (portant des ribosomes)
 - une apparition des structures dictyosomales développées.
- c) une formation de nouveaux organites intracellulaires, qui comprend :
- une faible mitochondriogenèse, surtout visible par la technique d'isolement *in vitro*
 - une formation de plastes peu différenciés.

Tous ces bouleversements ultrastructuraux qui n'avaient jamais été observés auparavant pendant la survie de tranches de tubercule de Pomme de terre indiquent que la survie provoque un début de dédifférenciation des cellules avec une tendance au retour à l'état méristématique ; la formation de nouvelles membranes intracellulaires est indispensable pour une telle évolution.

I I I - M O D I F I C A T I O N S
T O U C H A N T L E S P R O T E I N E S E T L E S L I P I D E S
M E M B R A N A I R E S
A U C O U R S D E L A S U R V I E

Les observations cytologiques effectuées sur les tranches de tissu ont suggéré l'existence d'une biogénèse importante de membranes intracellulaires. Il était donc nécessaire de suivre quantitativement cette biogénèse par des techniques biochimiques complémentaires. Ces techniques impliquent tout d'abord l'isolement de fractions cellulaires, riches en membranes, puis l'analyse et le dosage des constituants membranaires ; nous procèderons ainsi au dosage des protéines liées à ces fractions, à l'analyse et au dosage des constituants lipidiques membranaires, à la caractérisation des protéines enzymatiques par leur activité catalytique. Il convient cependant d'examiner auparavant la nature des fractions cellulaires isolées.

A - CARACTERISTIQUES DES FRACTIONS CELLULAIRES ISOLEES.

Les travaux classiques sur la survie avaient souligné le développement au cours des premières 24 heures d'une crise respiratoire et d'une importante protéogénèse. Les fractions cellulaires étudiées ont donc été les fractions mitochondriales, en raison de leur intervention dans le métabolisme énergétique, et les fractions "microsomales", en raison de l'importance du réticulum endoplasmique dans la biosynthèse des protéines. Quelques expériences ont porté sur une fraction recueillie à 1500 g, ainsi que sur le surnageant cytoplasmique.

1) Observations morphologiques.

a) Mitochondries. .

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont

relativement propres ; les contaminants extérieurs ne sont pas abondants. Cependant, dans certaines préparations, on peut entraîner des enclaves cytoplasmiques renfermant des fragments de réticulum endoplasmique ainsi que quelques peroxysomes. Par contre, dans ces fractions, aucune bactérie n'est visible.

Le passage sur gradient de saccharose élimine toutes les contaminations que nous venons de signaler ; les images obtenues (*Fig. 13*) montrent un très grand nombre de mitochondries avec très peu de structures contaminantes. En particulier, on ne note pas la présence de plastes jeunes qui, par leur petite taille (et leur faible densité probable), risqueraient de se mélanger aux mitochondries.

Signalons d'emblée qu'aucune différence caractéristique ne s'observe lorsque l'on compare des micrographies de culots mitochondriaux avant ou après survie.

On distingue dans les micrographies des mitochondries plus sombres que d'autres. Cette différence se voit nettement dans les micrographies à plus fort grandissement (*Fig. 14 et 15*). Les aspects des structures mitochondriales présentes dans les culots peuvent être interprétés d'après les travaux de HACKENBROCK (1966) qui a mis en évidence des modifications importantes de l'ultrastructure cellulaire en fonction des états métaboliques des organites. Selon CHANCE et WILLIAMS (1955), lorsque les mitochondries sont mises en présence de substrat (succinate, par exemple) et d'ADP, la consommation d'oxygène est intense, c'est le stade 3 ; le stade 4 est caractérisé par l'épuisement de l'ADP ; le stade 2 précède l'addition d'ADP. HACKENBROCK (1966) décrit une structure "orthodoxe" qui est la structure classique : matrix claire, crêtes nettes, abondantes et régulières, membrane interne épousant la membrane externe. Cet état est particulièrement rencontré dans les mitochondries placées au stade 4. Cette structure correspond aux images observées *in situ* et *in vitro*. La structure condensée, très caractéristique, présente une matrix très sombre, de plus petit volume, contractée ; les crêtes sont très distendues et se détachent en zones claires de formes irrégulières. La membrane interne s'éloigne de la membrane externe. L'espace intermembranaire est fortement distendu. Cet aspect s'obtient d'une façon caractéristique lorsque l'ADP est ajouté dans le milieu d'incubation des mitochondries au stade 4. Enfin HACKENBROCK note la présence d'un état intermédiaire entre la structure orthodoxe et condensée : la matrix est plus dense que dans la structure orthodoxe, les crêtes sont

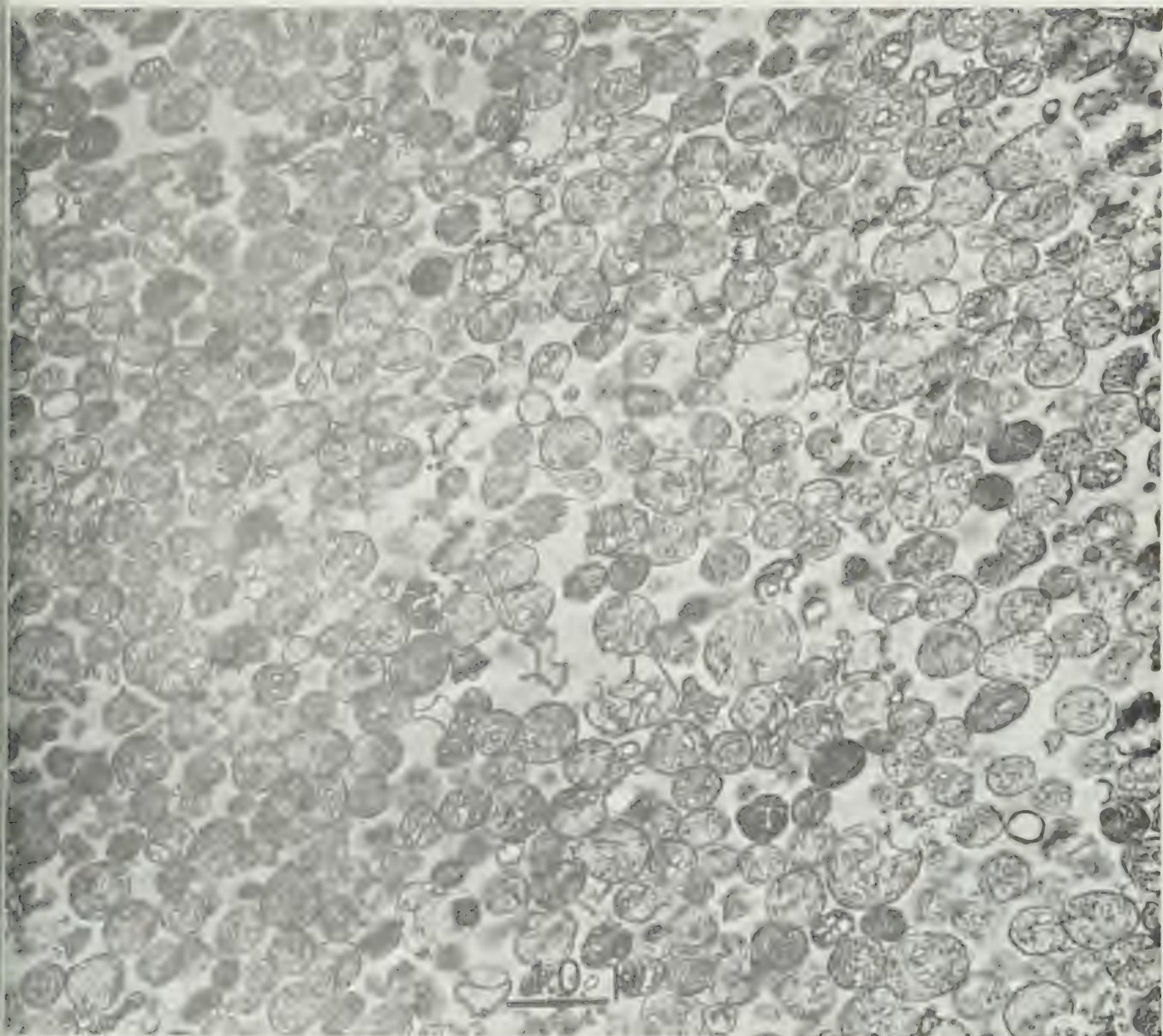


Fig. 13. Mitochondries isolées de tranches de tubercules fraîches et purifiées sur gradient de saccharose.

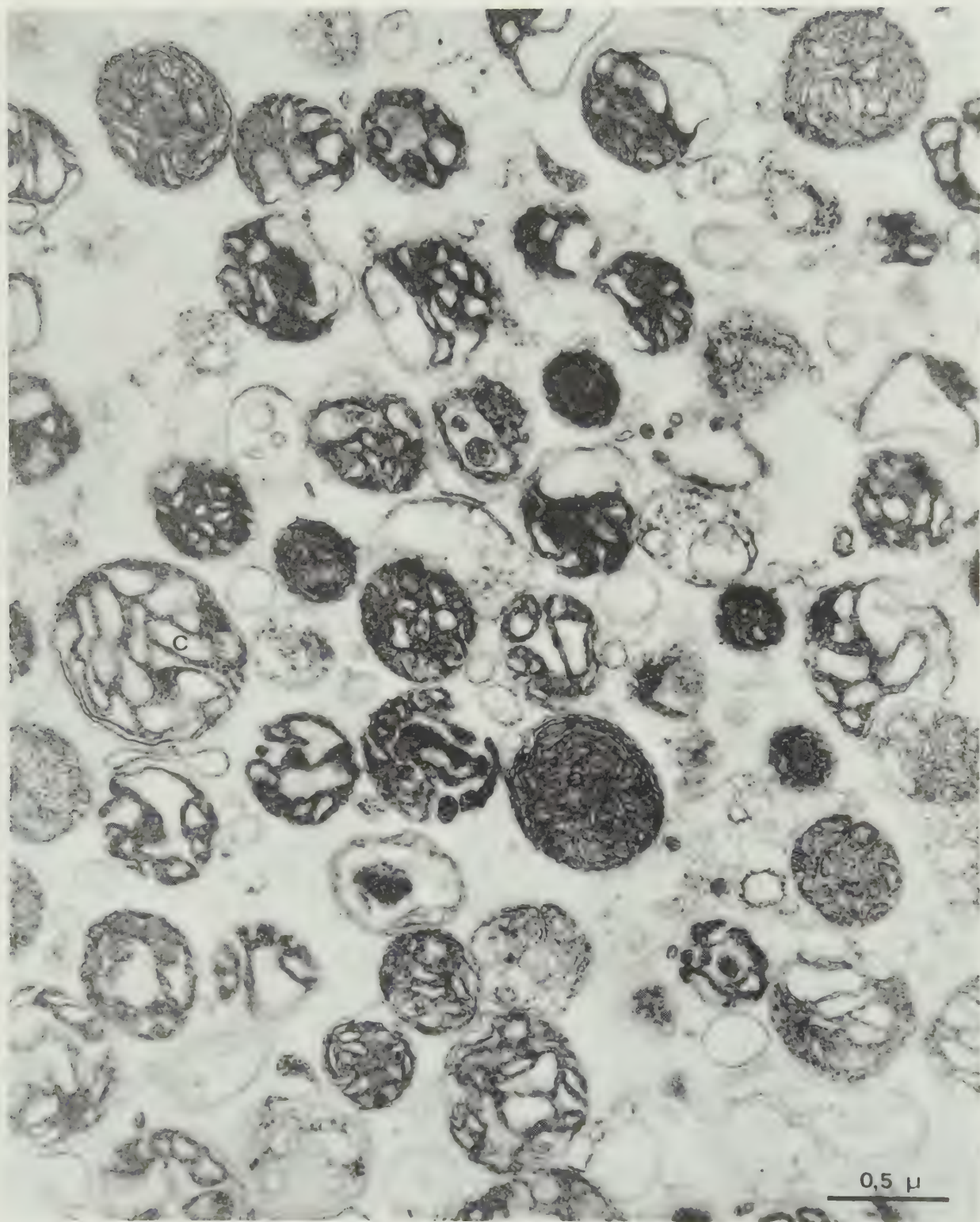


Fig. 14. Mitochondries isolées de tranches en survie et purifiées sur gradient de saccharose (a = structure orthodoxe ; c = structure contractée).

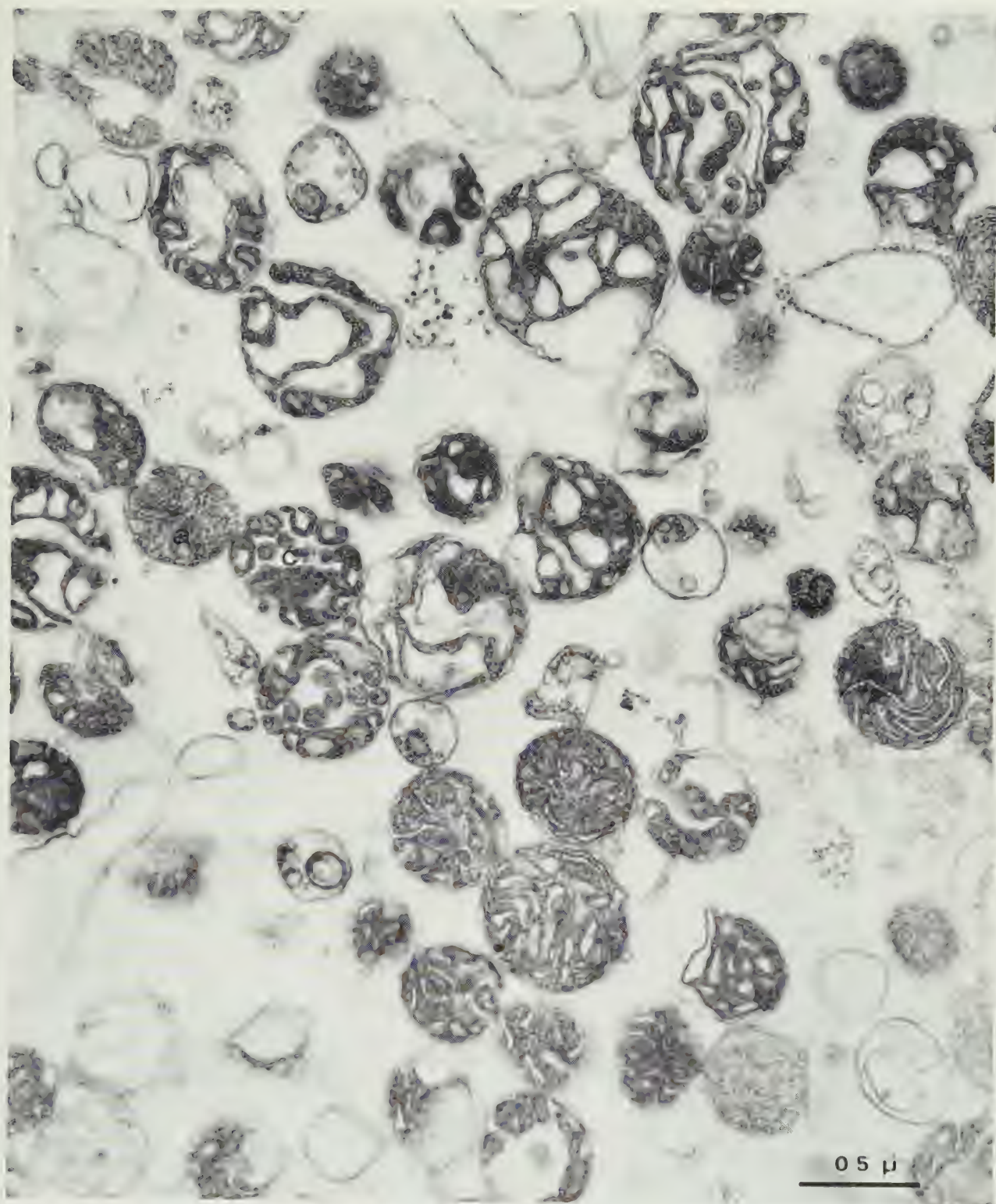


Fig. 15. Mitochondries isolées de tranches fraîches et purifiées sur gradient de saccharose.

plus nettement dessinées que dans la structure condensée.

On retrouve dans nos micrographies les mêmes images qu'HACKENBROCK (Fig. 14, 15). La coexistence de ces diverses formes dans un même culot s'expliquerait par l'état métabolique variable des différentes mitochondries ; il est évident que si la suspension mitochondriale est laissée pendant 15 à 30 minutes, sans ajouter de l'ADP ou du substrat, on obtient surtout des structures orthodoxes. HACKENBROCK a montré que les mitochondries finissent par acquérir une structure orthodoxe irréversible tout en présentant une phosphorylation oxydative très diminuée.

Les aspects condensés de la matrix mitochondriale nous renseignent donc sur le bon état physiologique des mitochondries puisque les modifications ultrastructurales nécessitent selon HACKENBROCK une intégrité fonctionnelle des organites pour se manifester.

Un autre facteur important qui intervient dans l'ultrastructure mitochondriale est l'osmolarité du milieu de broyage (GUILLOT-SALOMON, 1972) ; les concentrations élevées en saccharose (0,4 M) que nous utilisons favorisent la présence de formes contractées.

Ces structures contractées ne sont pas dues au passage des organites dans les couches concentrées du gradient discontinu de saccharose ; en effet les culots examinés avant purification par gradient révèlent l'existence de structures contractées.

D'autre part, ces structures mitochondriales condensées ne sont pas provoquées par l'isolement des organites *in vitro* ; elles existent *in situ* comme on peut le voir dans les micrographies (Fig. 6). Cette observation *in situ* des mitochondries à matrix dense est rendue possible par l'amélioration des techniques de fixation des coupes de tissu pour l'examen en microscopie électronique. Les formes "orthodoxes" ("gonflées") des mitochondries s'observent dans les conditions où l'osmolarité des fixateurs utilisés est trop faible.

Des aspects très comparables aux structures mitochondriales observées *in vitro* ont été obtenus par DUCET et al. (1969) dans les suspensions mitochondriales du tubercule de Pomme de terre. COULOMB (1969) ne note aucune modification ultrastructurale provoquée par la survie, ce qui est en accord avec nos propres observations ; COULOMB (1969) observe cependant un peu plus de formes gonflées dans les mitochondries isolées après survie ; SAKANO et al. (1968) notent une certaine hétérogénéité de la

population mitochondriale dans le tissu de Patate douce maintenu en survie.

b) Microsomes.

Les "microsomes" peuvent être définis comme la fraction subcellulaire sédimentant après une heure de centrifugation à 100.000 g à partir d'un broyat de tissu initialement homogénéisé, après que les noyaux, chloroplastes et mitochondries aient été éliminés (THIBAUDIN, 1970) ; cette fraction "microsomale" comprend des vésicules qui résultent de la fragmentation du réticulum endoplasmique.

L'aspect cytologique de ces fractions "microsomales" diffère beaucoup selon le milieu d'isolement.

b₁ - Milieu pauvre en magnésium.

Lorsque les "microsomes" sont isolés dans le milieu de broyage utilisé pour recueillir les mitochondries (et par conséquent pauvre en magnésium et riche en éthylène-diamine-tétraacétique), les culots obtenus sont constitués de vésicules de taille très diverse, leur diamètre variant de 150 à 600 nm (*Fig. 16*). Aucune contamination par les mitochondries n'a été notée dans ces fractions cellulaires.

D'autre part, aucune modification morphologique ne s'observe lorsque l'on compare les culots isolés de tissu frais ou de tissu en survie.

Toutes les déterminations enzymatiques, les dosages, ainsi que les incorporations de précurseurs radioactifs, ont été réalisés sur des fractions microsomales ainsi préparées.

b₂ - Milieu riche en magnésium.

L'addition du magnésium permet de maintenir les sous-unités ribosomales associées entre elles, ainsi que les ribosomes associés aux membranes (PETERMANN, 1964). Effectivement les culots microsomaux recueil-

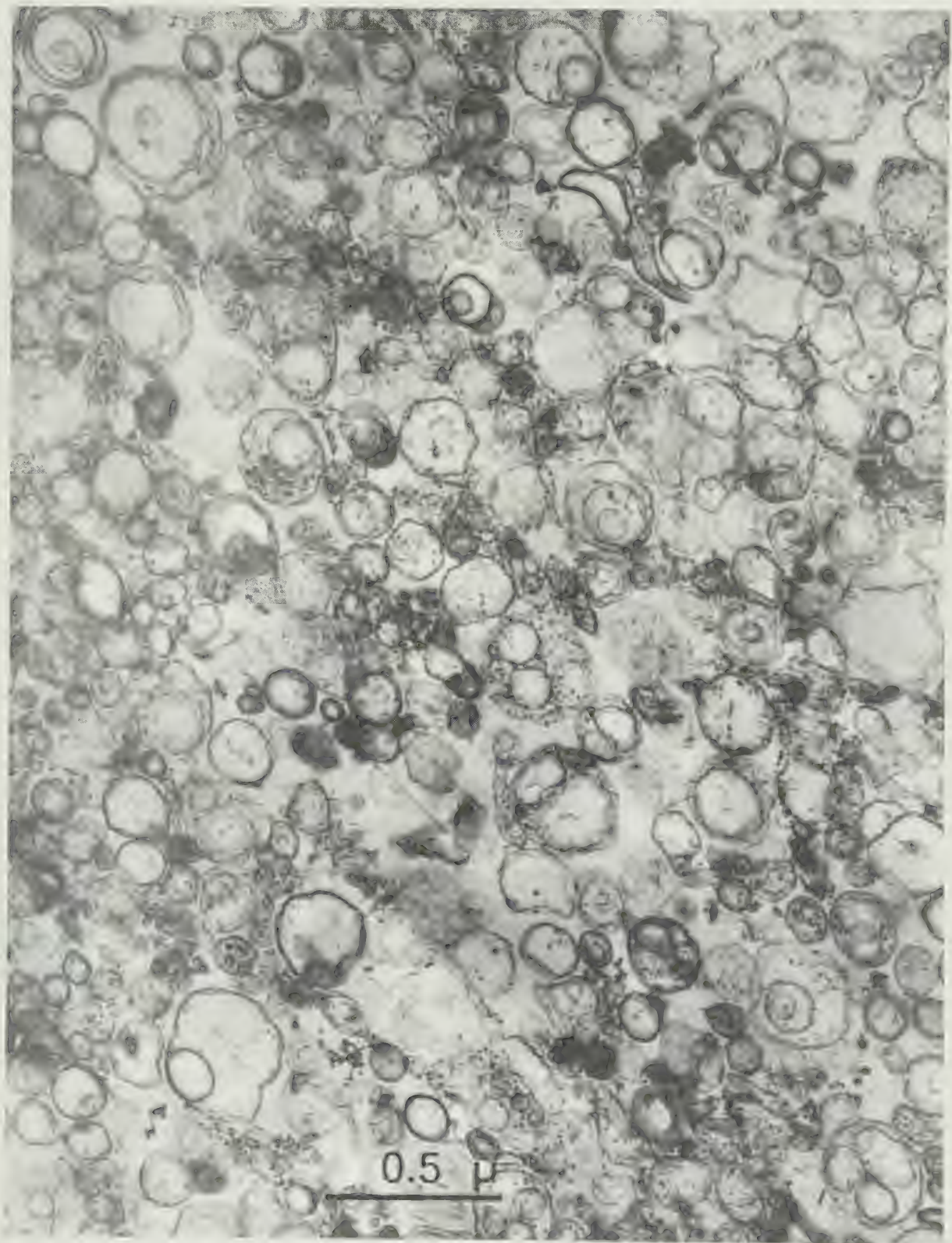


Fig. 16. Fraction microsomale isolée de tranches en survie. Le milieu de broyage est riche en EDTA et pauvre en magnésium.

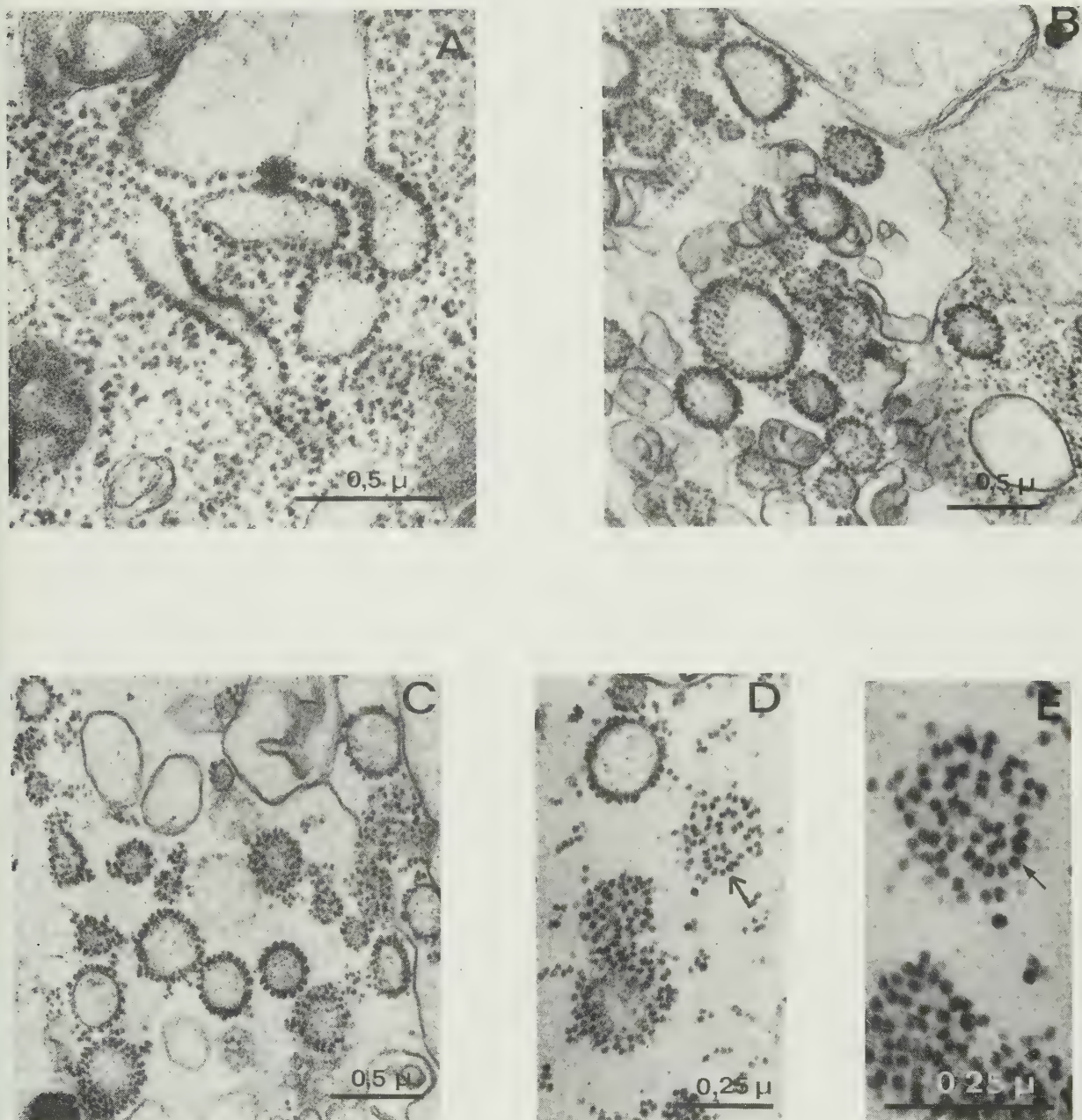


Fig. 17. Vésicules microsomales portant des ribosomes recueillies à partir de tranches en survie, après centrifugation à 1.500 g pendant 10 mn. On distingue en B, C, D et E des sphères couvertes de ribosomes et, en D et E, de polyribosomes (flèche). Ces sphères proviennent de la fragmentation du réticulum endoplasmique (A).

lis en milieu de broyage riche en magnésium et pauvre en EDTA, à partir de tranches en survie, montrent des vésicules portant des ribosomes (*Fig. 17*). Ceci confirme clairement l'origine des vésicules microsomales qui résultent de la fragmentation des nappes du réticulum endoplasmique granulaire.

Il est important de noter que c'est seulement après survie que de telles images sont obtenues. Avant survie, on obtient seulement des vésicules lisses avec beaucoup de ribosomes libres. Les ribosomes sont visibles parce que le magnésium permet de réunir les deux sous-unités ribosomales. De telles images ne pouvaient être obtenues dans les culots recueillis en milieu riche en EDTA qui chélate le magnésium. Nous confirmons ainsi l'origine des vésicules microsomales, provenant de la fragmentation des profils du réticulum endoplasmique granulaire ; ces sphères sont hérissées de ribosomes (CLAUDE, 1946 ; PALADE et SIEKEWITZ, 1956 ; DALLNER et ERNSTER, 1968). La présence de structures polyribosomales intactes confirme leur association étroite avec les nappes du réticulum endoplasmique. De telles vésicules ne sont obtenues que dans le cas de tranches maintenues préalablement en survie. Les microsomes isolés de tissu frais ne présentent que des vésicules lisses.

a) Conclusions.

Les fractions cellulaires étudiées - mitochondries et microsomes - sont d'une pureté satisfaisante et sont exemptes de contaminations réciproques, si l'on en juge par la microscopie électronique. L'aspect des organites cellulaires suggère une préservation correcte de leurs activités physiologiques.

2) Activités physiologiques.

Nous avons successivement étudié les capacités d'oxydation de substrats respiratoires par les mitochondries, le couplage entre la phosphorylation et l'oxydation des substrats et le fonctionnement de quelques enzymes liées aux transferts d'électrons ; enfin, l'activité de la glucose-6-phosphatase, que l'on considère classiquement liée aux microsomes a été également mesurée.

TABLEAU V

Caractéristiques énergétiques des mitochondries isolées de tissu frais ou en survie.

Les valeurs indiquées sont les moyennes de 4 expériences.

		FRAIS	SURVIE
FRACTIONS BRUTES	$\mu\text{l O}_2/\text{h}/10 \text{ g tissu}$	120	268
	nanomoles $\text{O}_2/\text{h}/\text{mg protéines}$	1.780	2.080
	$\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{mg protéines}$	40,0	44,7
	contrôle respiratoire	4,0	3,0
	ADP/O	1,7	1,3
FRACTIONS PURIFIÉES	$\mu\text{l O}_2/\text{h}/10 \text{ g tissu}$	115	253
	nanomoles $\text{O}_2/\text{h}/\text{mg protéines}$	10.320	12.600
	$\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{mg protéines}$	230	282
	contrôle respiratoire	3,0	2,6
	ADP/O	1,27	1,14

a) Activité respiratoire et couplage énergétique des mitochondries.

La technique ampérométrique nous a permis d'apprécier à la fois les intensités respiratoires des mitochondries isolées et l'efficacité du couplage entre oxydations et phosphorylations.

a₁ - Vitesses d'oxydation.

L'oxydation du succinate par des mitochondries isolées de tranches fraîches ou maintenues en survie est intense (*Tableau V*) ; en présence de succinate et d'ADP, 1780 nanomoles d'oxygène sont absorbées en 1 heure par 1 mg de protéines mitochondriales isolées de tranches fraîches. Les valeurs sont un peu plus élevées avec les mitochondries isolées de tranches en survie (2080). Après purification des culots de mitochondries bruts, des valeurs beaucoup plus élevées sont obtenues : respectivement 10.320 et 12.600 ; cette augmentation de l'activité oxydative rapportée au mg de protéines s'explique par l'élimination dans le gradient de protéines non mitochondriales. Cet accroissement signifie aussi que les culots obtenus après gradient sont beaucoup plus purs. Les valeurs d'intensité respiratoire obtenues avec les mitochondries purifiées sont en bon accord avec celles trouvées par LANCE et BONNER (1968) pour la Pomme de terre (8450 nmoles/h/mg protéines) et voisines de celles signalées pour le Chou-fleur (11.000 nmoles/h/mg).

Les intensités d'oxydation des substrats pour les mitochondries isolées de tranches en survie sont légèrement plus élevées que les vitesses mesurées pour les mitochondries isolées de tissu frais. Cette différence est significative et a été retrouvée dans plusieurs expériences. Si l'on exprime les intensités par rapport au volume de suspension mitochondriale isolée d'un même poids de tranches fraîches ou maintenues en survie, l'augmentation est significative : en présence de succinate et d'ADP, respectivement 120 ou 268 μ l d'oxygène sont consommés en 1 heure par un volume de suspension mitochondriale isolée de 10 g de tissu frais ou de tissu en survie. Ce résultat confirme les premières données de HACKETT et al. (1960) et COTTE-MARTINON et al. (1969). Nous reviendrons plus loin sur l'interprétation possible de ces données.

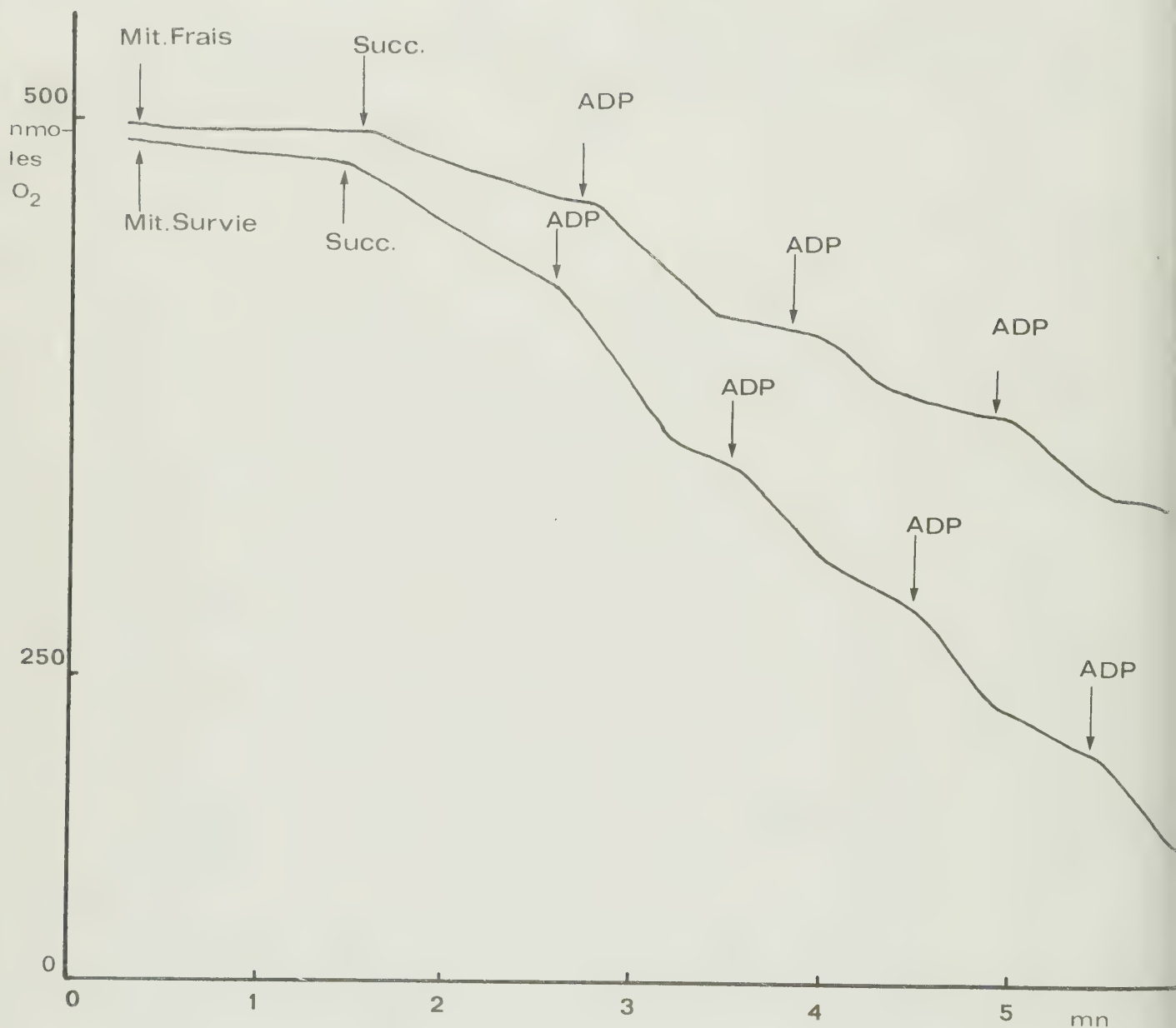


Fig. 18

Traces polarographiques obtenues à partir de mitochondries purifiées isolées de tranches fraîches (Mit.Frais) ou en survie (Mit.Survie). Les conditions expérimentales sont expliquées dans le texte. Le temps de déroulement de l'enregistrement est indiqué en mn. Les flèches indiquent les différentes additions de substrats (Succ=succinate). Les quantités d'oxygène présentes dans la fiole de mesure sont exprimées en nanomoles.

a₁ - Contrôle respiratoire.
.....

La mesure du rapport définissant le contrôle respiratoire (C. R.) donne de précieuses indications sur l'intégrité fonctionnelle des suspensions mitochondriales isolées. Le maintien du couplage étroit entre les oxydations et les phosphorylations d'ADP en ATP est en effet une indication importante de la bonne qualité des préparations mitochondriales parce que l'on admet que les systèmes de couplage constituent dans les organites les systèmes enzymatiques les plus fragiles.

Dans les figures (18 A et B) on observe , lorsque l'ADP est ajouté dans le milieu, une augmentation importante de la consommation d'oxygène, indiquant un transfert plus intense des électrons de la chaîne respiratoire (état 3 de CHANCE et WILLIAMS). Lorsque tout l'ADP est consommé, l'absorption d'oxygène revient à son intensité normale (stade 4) ; ceci démontre qu'un bon couplage existe entre l'oxydation et la phosphorylation (Tableau V).

Le rapport entre les vitesses d'oxydation à l'état 3 et les vitesses d'oxydation à l'état 4 est le "contrôle respiratoire". Les valeurs obtenues, variant de 2,6 à 4,0 selon les conditions de l'expérience, sont satisfaisantes et se situent au niveau des meilleurs résultats obtenus sur des mitochondries végétales (LANCE et BONNER, 1968 ; LANCE, 1971 ; DOUADY et al., 1972).

Il est intéressant de signaler que les mitochondries, après passage sur gradient de saccharose, gardent d'excellentes valeurs de contrôle respiratoire ; ceci peut s'expliquer par la présence de la sérum-albumine de Boeuf que nous introduisons dans les couches de saccharose du gradient, ce qui permet aux mitochondries d'être constamment protégées contre les effets découplants des acides gras libres (DALGARNO et BIRT, 1963 ; BADDELEY et HANSON, 1967).

Les valeurs du contrôle respiratoire des mitochondries après survie sont légèrement inférieures à celles obtenues avec les mitochondries isolées de tranches fraîches, ce qui traduit une certaine baisse dans l'efficacité des phosphorylations oxydatives.

Le rapport ADP/O est le quotient de la quantité d'ADP phosphorylée sur la quantité d'oxygène absorbée pendant cette phosphorylation (consommation totale d'oxygène au stade 4) ; ce rapport, analogue au

rapport P/O, a une valeur théorique limitée à 2 pour le succinate. On atteint, avec les mitochondries isolées de tranches fraîches et purifiées sur gradient, des valeurs égales à 1,7 en moyenne (*Tableau V*), ce qui indique un bon couplage énergétique. LANCE (1971) signale des valeurs moyennes de 1,48 pour les mitochondries isolées de Chou-fleur.

Dans les mitochondries isolées de tissus en survie, les valeurs des rapports ADP/O sont nettement inférieures, aussi bien pour les culots bruts que pour les organites purifiés. Ce résultat confirme que la respiration des mitochondries isolées de tissu en survie est un peu moins efficace que celle des mitochondries de tissu frais.

La diminution du rendement des phosphorylations oxydatives dans les mitochondries après survie a été observée par ASAHU et al. (1966) sur de la patate douce et par COTTE-MARTINON et al. (1969) sur la Pomme de terre. Comment expliquer cette baisse de rendement des oxydations mitochondriales alors que leur intensité a augmenté ? Nous savons que des modifications qualitatives de la chaîne de transfert d'électrons se produisent :

- résistance au cyanure de sodium (HACKETT et al., 1960). Ces données viennent cependant d'être partiellement infirmées par des expériences du laboratoire de DUCET (Communication personnelle) réalisées sur des mitochondries purifiées en rotor zonal.
- transformation des teneurs respectives en cytochromes. Dans les mitochondries des tissus en survie, HACKETT et al. (1960) en étudiant les culots bruts, et COTTE-MARTINON et al. (1969) en purifiant les fractions en rotor zonal, ont montré que les rapports : teneur en cytochrome $a + a_3$ / teneur en cytochrome b diminuaient au cours de la survie ; la teneur en cytochrome $a + a_3$ reste stable au cours de la survie, alors que la teneur en cytochrome b augmente. Si une contamination par des microsomes peut éventuellement expliquer l'augmentation du cytochrome b, on peut aussi penser que cet accroissement correspond à une augmentation du cytochrome b mitochondrial, en particulier dans les expériences de COTTE-MARTINON et al. (1969) où les techniques de purifications sont très poussées.

A notre avis, les modifications des propriétés respiratoires des mitochondries après survie peuvent s'expliquer en partie par une biogénèse de nouvelles membranes mitochondriales. En effet, tout se passe comme si la partie terminale de la chaîne de transfert d'électrons était déficiente (notamment en cytochrome oxydase) dans les mitochondries des tissus en

survie (mais les expériences du laboratoire de M. DUCET (communication personnelle) affaiblissent quelque peu cet argument). Si la biogénèse des différents constituants de la chaîne respiratoire se produit à des vitesses différentes pour chacun, il peut s'ensuivre un déséquilibre dans la composition de la chaîne respiratoire, à certains moments. Si l'on admet, par exemple, que la synthèse du cytochrome $a + a_3$ est lente, pendant les premiers temps de survie, alors que la biogénèse des protéines mitochondriales se produit activement, on observera une *dilution* de la teneur en cytochromes dans les mitochondries nouvelles ou transformées par la survie : ce phénomène a été observé par COTTE-MARTINON et al. (1969).

Cette hypothèse supposant une biogénèse de matériel mitochondrial ne nous renseigne pas sur la nature de la respiration induite au cours de la survie des rondelles de Pomme de terre. S'agit-il de la mise en place d'une voie latérale particulière, comme le suggèrent LANCE et BONNER (1968), à propos de leurs travaux sur l'*Arum* ? S'agit-il d'une respiration faisant intervenir une dégradation des lipides, comme le proposent JACOBSON et al. (1970) qui ont mesuré le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du gaz carbonique dégagé par les rondelles de Pomme de terre maintenues en survie et traitées par le cyanure de sodium ? A l'heure actuelle, aucune réponse définitive n'existe.

b) Activités enzymatiques associées aux fractions cellulaires.

Les complexes enzymatiques suivants ont été étudiés :

- NADH-cytochrome c-réductase sensible à l'antimycine A. Ce complexe enzymatique est associé exclusivement aux mitochondries (HACKETT et al., 1960) et se trouve localisé dans la membrane interne mitochondriale (foie de Rat) (LEVY et al., 1969). L'inhibition par l'antimycine A indique la participation de ce complexe à la chaîne respiratoire.
- NADH-cytochrome c-réductase insensible à l'antimycine A, associée surtout aux microsomes (HACKETT et al., 1960) ou en partie à la membrane externe de la mitochondrie (foie de Rat : LEVY et al., 1969).
- succinate-cytochrome c-réductase, associée aux mitochondries (membrane interne de la mitochondrie de foie de Rat, SOTTOCASA et al., 1967).
- glucose-6-phosphatase, enzyme associée classiquement aux membranes microsomales (BEAUFAY et DE DUVE, 1954).

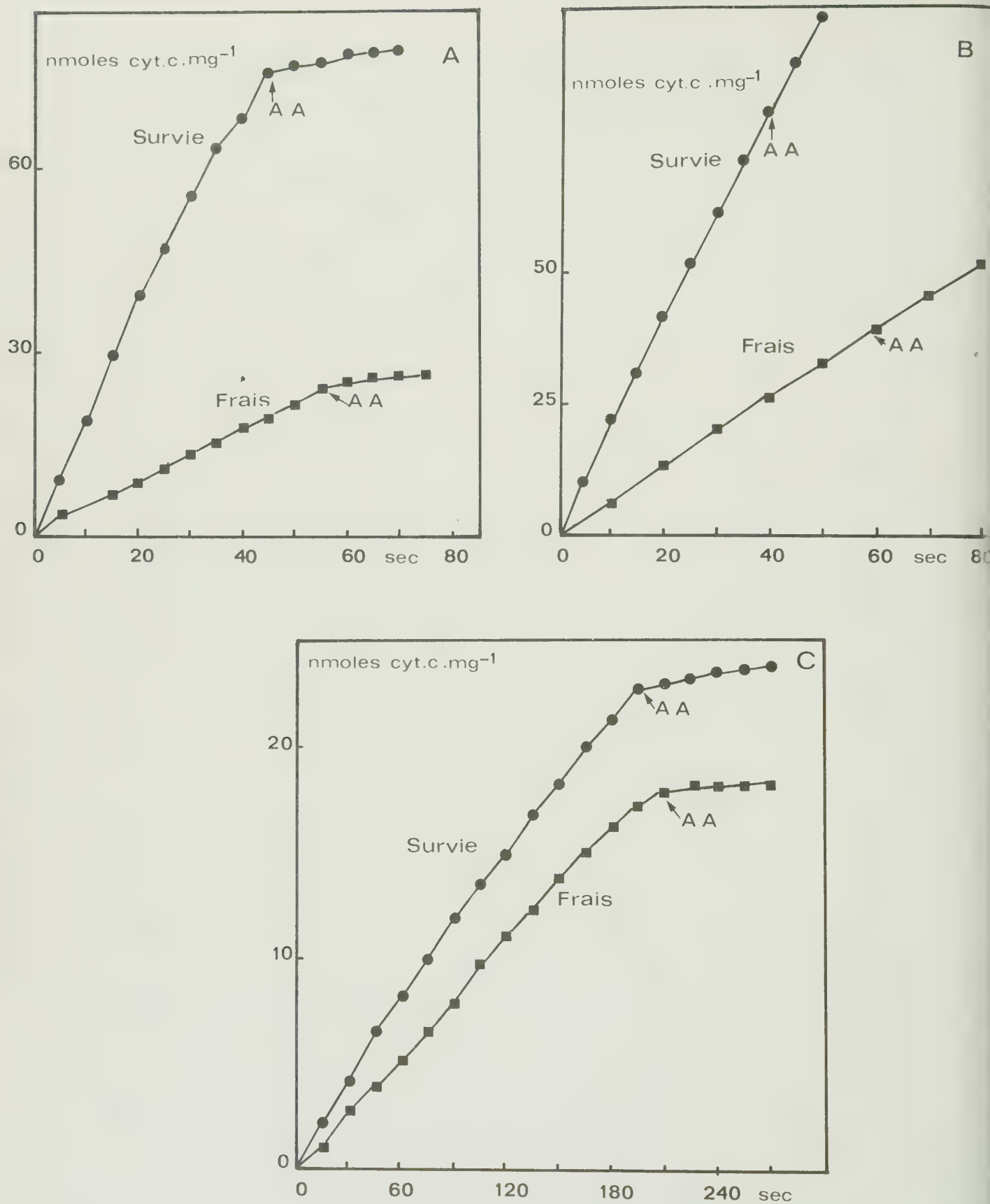


Fig. 19 Stimulation des activités NADH-cytochrome c réductasiques des mitochondries (A) et des microsomes (B) et des activités succinate-cytochrome c réductasiques des mitochondries (C) au cours de la survie. Action de l'antimycine A (AA). En ordonnée sont indiquées les quantités de cytochrome c réduit, en nanomoles par mg de protéines. Le temps de la réaction enzymatique est indiqué en abscisse.

b₁ - NADH-cytochrome c-réductase mitochondriale.
.....

Les mitochondries isolées de tranches fraîches et purifiées sur gradient ont une activité NADH-cytochrome c-réductasique élevée (*Tableau VI*) : 30 nanomoles de cytochrome c réduit par mg de protéines et par minute ; ces valeurs sont voisines de celles trouvées par HACKETT et al. (1960) (16 nanomoles/mn/mg pour les mitochondries du tubercule de Pomme de terre) et JOLLIOT (1970) (77 à 125 nanomoles pour les mitochondries de Chou-fleur). L'inhibition par l'antimycine A est très élevée : 91% d'inhibition, ce qui confirme bien que l'activité enzymatique mesurée est celle correspondant à l'enzyme de la chaîne respiratoire (*Fig. 19a*). La vitesse de la réaction est constante pendant les 3 premières minutes de l'expérience. Les vitesses déterminées sur des mitochondries isolées de tissu en survie sont beaucoup plus élevées que celles mesurées sur les tissus frais, qu'elles soient exprimées par rapport à un volume de suspension mitochondriale isolée d'une même quantité de matière ou par rapport à la quantité de protéines. L'augmentation, considérable, est de plus de 400% ; ce résultat confirme sur des mitochondries purifiées les données de HACKETT et al. (1960). Il est important de noter que l'activité enzymatique induite reste sensible à l'antimycine A, ce qui exclut une contamination élevée des culots mitochondriaux par les microsomes. Il existe cependant une activité enzymatique résiduelle résistante à l'antimycine A (2 à 8%) ; on pourrait attribuer cette activité résiduelle à une contamination microsomale ; mais il ne faut pas oublier que la membrane externe mitochondriale, dans le foie de Rat, contient une NADH-cytochrome c-réductase résistante à l'antimycine A ; une telle activité enzymatique existe probablement dans les mitochondries végétales, bien qu'aucune démonstration claire n'ait été apportée. WILSON et HANSON (1969) ont formulé une hypothèse semblable en étudiant l'oxydation du NADH par des mitochondries de Blé. Il est donc possible d'attribuer l'activité résistante à l'antimycine A, dans nos expériences, à l'existence de cette enzyme encore hypothétique.

b₂ - NADH-cytochrome c-réductase microsomale.
.....

Les culots microsomaux présentent une activité enzymatique élevée,

TABLEAU VI

Activités enzymatiques associées aux microsomes ou aux mitochondries de tubercule de Pomme de terre.

Les activités sont exprimées en nanomoles de cytochrome c réduit par 1 mg de protéines ou en micromoles de phosphate libérées par mg de protéines et par minute.

	Témoin	+ Antimycine A	nanomoles/culot isolé de 10g. de matière fraîche
<u>NADH-cytochrome c-réductase</u> (nanomoles cyt. c réduit. $\text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)			
Microsomes (Frais)	39	38 (2,5% inhib.)	121
Microsomes (Survie)	122	122 (0% inhib.)	539
Mitochondries (Frais)	30,2	2,5 (91,7% inhib.)	10,1
Mitochondries (Survie)	109	8,2 (92,5% inhib.)	38
<u>Succinate-cytochrome c-réductase</u> (nanomoles cyt. c réduit. $\text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)			
Mitochondries (Frais)	8,1	0,05 (99% inhib.)	
Mitochondries (Survie)	5,1	0,02 (99% inhib.)	
<u>Glucose-6-phosphatase</u> (micromoles phosphate libérées. $\text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)			
Microsomes (Frais)	0,123		
Microsomes (Survie)	0,093		
Mitochondries (Frais)	0,01		
Mitochondries (Survie)	0,015		

beaucoup plus forte que celle associée aux mitochondries quand elle est exprimée par rapport aux organites isolés d'une même quantité de matière fraîche initiale. Cependant cette activité microsomale est tout à fait insensible à l'antimycine A. L'addition de cet inhibiteur à la même concentration que celle utilisée pour les mitochondries ne provoque pratiquement pas d'inhibition (*Fig. 19b*).

Les valeurs des activités enzymatiques mesurées dans nos expériences sont du même ordre de grandeur que celles déterminées par d'autres auteurs : microsomes de pétiole de Betterave (MARTIN et MORTON, 1956) (70 nanomoles/mn/mg protéines), de racines de Blé (MARTIN et MORTON, 1956) (400 nanomoles) ou de parenchyme de Pomme (THIBAUDIN, 1970) (26 nanomoles).

L'activité enzymatique augmente considérablement après survie (plus de 4 fois en moyenne). Après survie, cette activité reste constamment insensible à l'antimycine A.

b₃ - Succinate-cytochrome c-réductase mitochondriale.

L'activité de la succinate-cytochrome c-réductase est moins intense que l'activité de la NADH-cytochrome c-réductase (8,1 nanomoles/mn/mg). L'inhibition par l'antimycine A est totale (*Fig. 19b*) (*Tableau VI*).

Contrairement aux activités enzymatiques précédemment décrites, l'activité de la succinate-cytochrome c-réductase diminue dans les mitochondries après survie (5,1 au lieu de 8,1 nanomoles/mn/mg). Après survie, l'inhibition par l'antimycine A reste importante.

b₄ - Glucose-6-phosphatase microsomale.

Comme le montre le tableau VI, l'activité glucose-6-phosphatasique est très importante dans les microsomes et très faible dans les mitochondries. Cependant il convient de signaler que la détermination de cette activité enzymatique est assez délicate et, dans quelques expériences, en raison probablement de variations dans le pH du milieu final (cf. Méthodes expérimentales), les mitochondries contenaient une activité anormalement élevée.

Cependant on retrouve dans toutes les expériences une diminution de l'activité de la glucose-6-phosphatase après survie. Ce résultat a été confirmé récemment par CASTELFRANCO et al. (1971).

Les valeurs obtenues dans nos expériences s'accordent bien avec celles trouvées par d'autres auteurs : microsomes de Pomme (THIBAUDIN, 1970) ou de foie de Rat (DALLNER et al., 1965), respectivement 118 et 200 μ moles de phosphatase libérées par mn et par mg de protéines.

DISCUSSION

Cette étude des activités de quelques complexes enzymatiques a permis de confirmer la pureté des fractions cellulaires isolées et a indiqué une exaltation de certaines de ces activités enzymatiques pendant la survie.

La survie entraîne, en particulier, une stimulation spectaculaire de l'activité de la NADH-cytochrome c-réductase microsomale et mitochondriale. Cette exaltation est l'un des phénomènes les plus caractéristiques observés au cours de la survie. Nous rapprocherons plus loin ce résultat de l'induction de la NADH-cytochrome c-réductase au cours du développement du fœtus de Rat.

Les deux autres activités enzymatiques étudiées ne présentent pas une telle augmentation et même diminuent. Ce résultat diffère légèrement des données d'ASAHI et al. (1966) ; ces auteurs notent une augmentation appréciable de la cytochrome oxydase (92%) dans les mitochondries de Patate douce après survie des tissus pendant 24 heures ; de même VERLEUR (1969) signale une augmentation faible de la cytochrome oxydase et de la succinate oxydase mitochondriales pendant la survie des tranches de tubercule de Pomme de terre (10%).

Deux hypothèses peuvent être formulées :

- la première considère que l'activité de la succinate-cytochrome c - réductase mesurée *in vitro* est le reflet fidèle de l'activité de l'enzyme *in vivo*. Dans ces conditions, il est difficile de concilier d'une part l'oxydation importante du succinate après survie (suivie polarographiquement) et, d'autre part, l'augmentation de l'activité succinate-cyt. c-réductasique. On peut imaginer cependant que la chaîne respiratoire est complè-

tement modifiée par la *survie* et que le transfert des électrons du succinate à l'oxygène n'emprunte pas la voie classique.

- la deuxième hypothèse suppose que les activités mesurées *in vitro* ne sont pas le reflet des activités réelles *in situ* ; la succinate cytochrome c réductase et la glucose-6-phosphatase peuvent être abîmées lors de l'isolement des fractions cellulaires , leur activité étant ainsi diminuée. A l'appui de cette hypothèse, on peut rappeler que la succinate-cytochrome c réductase est beaucoup plus fragile que la NADH-cytochrome c-réductase (JOLLIOT, 1970) ; le premier complexe enzymatique résiste moins bien au maintien des organites pendant plusieurs jours à -20°C. D'autre part, la glucose-6-phosphatase est une enzyme fragile qui, dans les microsomes délipidifiés, perd toute son activité. Les résultats que nous avons obtenus ont été confirmés par CASTELFRANCO et al. (1971) pour la glucose-6-phosphatase. Ces auteurs concluent que la diminution de ce complexe enzymatique signifie probablement qu'il se produit une dégradation des membranes du réticulum endoplasmique ; nous savons que ceci est inexact. Nous pouvons cependant supposer que les nouvelles membranes du réticulum endoplasmique apparues après 24 heures de survie sont plus fragiles que les anciennes membranes du tubercule ; au cours de l'isolement des fractions cellulaires, les membranes néoformées pourraient plus facilement s'abîmer.

B - PROTEINES DES FRACTIONS CELLULAIRES.

1) Teneur en protéines.

La teneur en protéines des culots microsomaux est beaucoup plus élevée que celle des culots mitochondriaux isolés de la même quantité de matière fraîche. Le surnageant cytoplasmique contient une importante quantité de protéines (*Tableau VII*). On observe une augmentation appréciable de la teneur en protéines des fractions isolées des tissus en survie par rapport aux teneurs des fractions provenant de la même quantité de tissu frais : d'après de nombreuses expériences, l'augmentation s'établit en moyenne à 40% pour les microsomes, 80 à 100% pour les mitochondries purifiées sur gradient de saccharose et 11% pour le surnageant cytoplasmique .

TABLEAU VII

Teneurs en protéines et en phospholipides des fractions cellulaires isolées de 100 g de matière fraîche initiale de tubercule de Pomme de terre. Influence de la survie ; F = tissu frais ; S = tissu en survie. Les augmentations des teneurs sont indiquées en %.

	mg protéines/100g matière fraîche		mg phospholipide/100g matière fraîche		µg phospholipide/mg protéine	
	F	S	F	S	F	S
Mitochondries purifiées	3,5	6,4 (82%)	0,51	0,97 (+ 88%)	145	150
Mitochondries brutes	17,5	38,0 (+116%)	2,75	5,25 (+ 90%)	150	138
Microsomes	38	52,8 (+ 39%)	11,5	14,2 (+ 23%)	303	271
1500 g	5,1	13,7 (+170%)	0,35	0,77 (+110%)	68	56
Surnageant	254	294 (+ 11%)	1,2	1,3 (+ 10%)	4	4

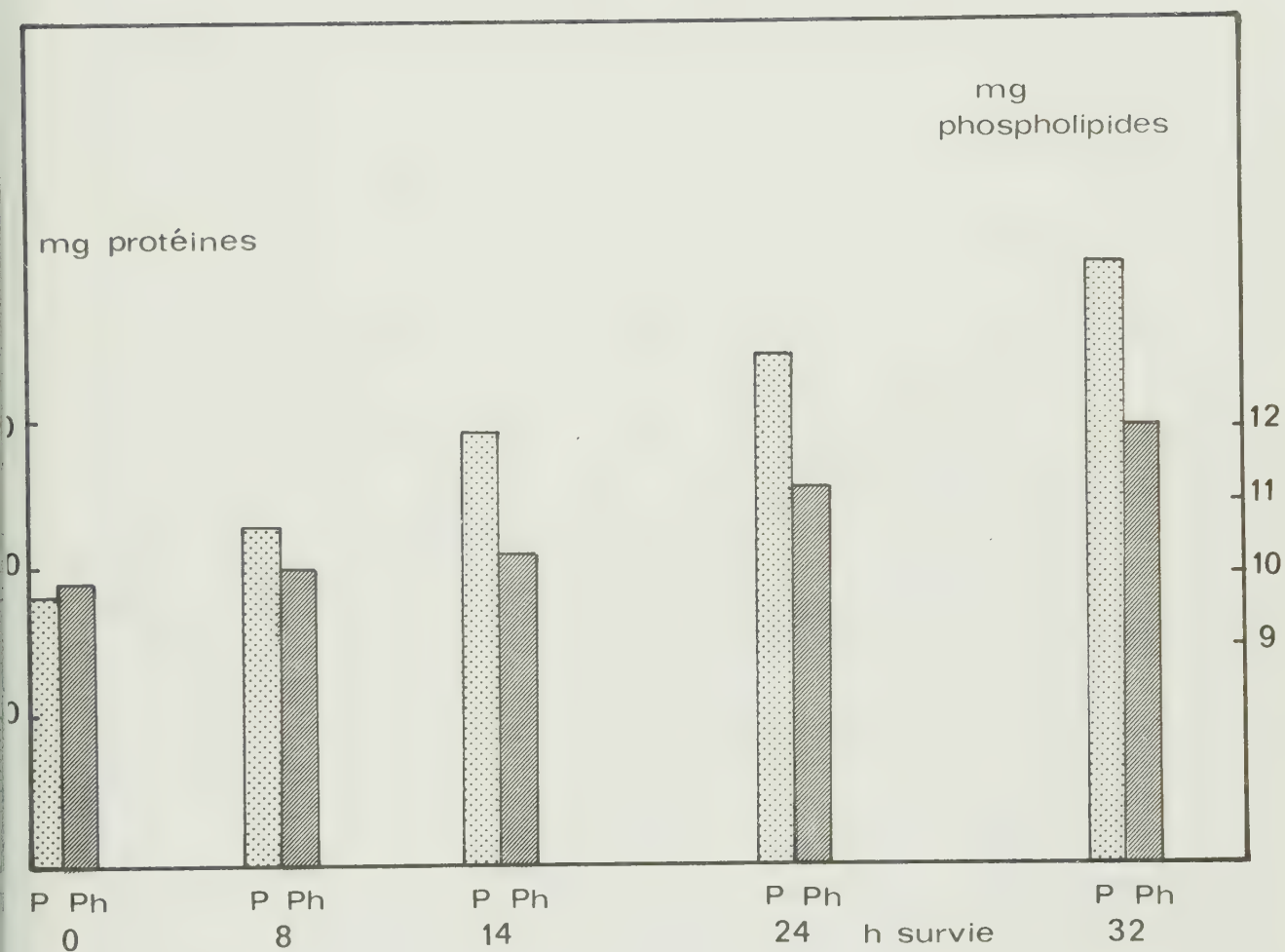


Fig. 20

Variations de la teneur en protéines (P) et en phospholipides (Ph) des culots microsomaux isolés de 100 g de matière fraîche initiale au cours de la survie (le temps de survie est indiqué en heures).

TABLEAU VIII

Dosage des protéines, des phospholipides et des acides gras des microsomes isolés de 4 lots identiques de 100 g de tissu frais.

mg / 100 g de tissu

	1	2	3	4
Protéines	38	39,2	35	36,5
Phospholipides	9,4	9,6	10,0	9,0
Acides gras	7,3	7,5	7,8	8,0

La grande reproductibilité du rendement des isolements de fractions cellulaires et la fidélité de la technique de dosage sont illustrées au tableau VIII où nous avons rassemblé les résultats concernant des culots microsomaux isolés de plusieurs lots de 15 g de tissu. La précision des dosages est d'environ 5%, ce qui établit que les augmentations observées au cours de la survie (20 expériences différentes) sont bien significatives.

Cette augmentation de la teneur en protéines s'installe progressivement au cours de la survie (*Fig. 20*).

2) Stimulation des capacités de biosynthèse.

L'étude de l'incorporation de la leucine marquée dans les tranches de tissu ou dans les fractions cellulaires *in vivo* confirme nettement l'importance des biosynthèses protéiques induites au cours de la survie. Comme le montre la figure 21, une importante stimulation de la radioactivité incorporée dans les microsomes s'observe dès les premières heures de la survie ; la stimulation atteint près de 1200%. Une stimulation de même ordre s'observe dans la fraction mitochondriale et dans le tissu entier.

Une telle activité biosynthétique, découverte par CLICK et HACKETT (1963) au niveau du tissu entier, a été retrouvée par PENKOV (1969) et KAHL (1971b) dans le tubercule de Pomme de terre, par CHAPMAN et EDELMAN (1967) dans les disques de Topinambour et par SAKANO et ASAHI (1969) dans la Patate douce.

L'intérêt d'une telle biosynthèse est d'autant plus grand que les protéines néoformées sont probablement des protéines membranaires. Nous avons plusieurs arguments en faveur de cette conception : nous dosons en effet des protéines précipitées à l'acide trichloracétique et non de l'azote soluble ; d'autre part les protéines dosées sont recueillies à partir de fractions membranaires isolées du tissu entier. Il sera intéressant de rechercher dans un travail ultérieur la nature précise de ces protéines.

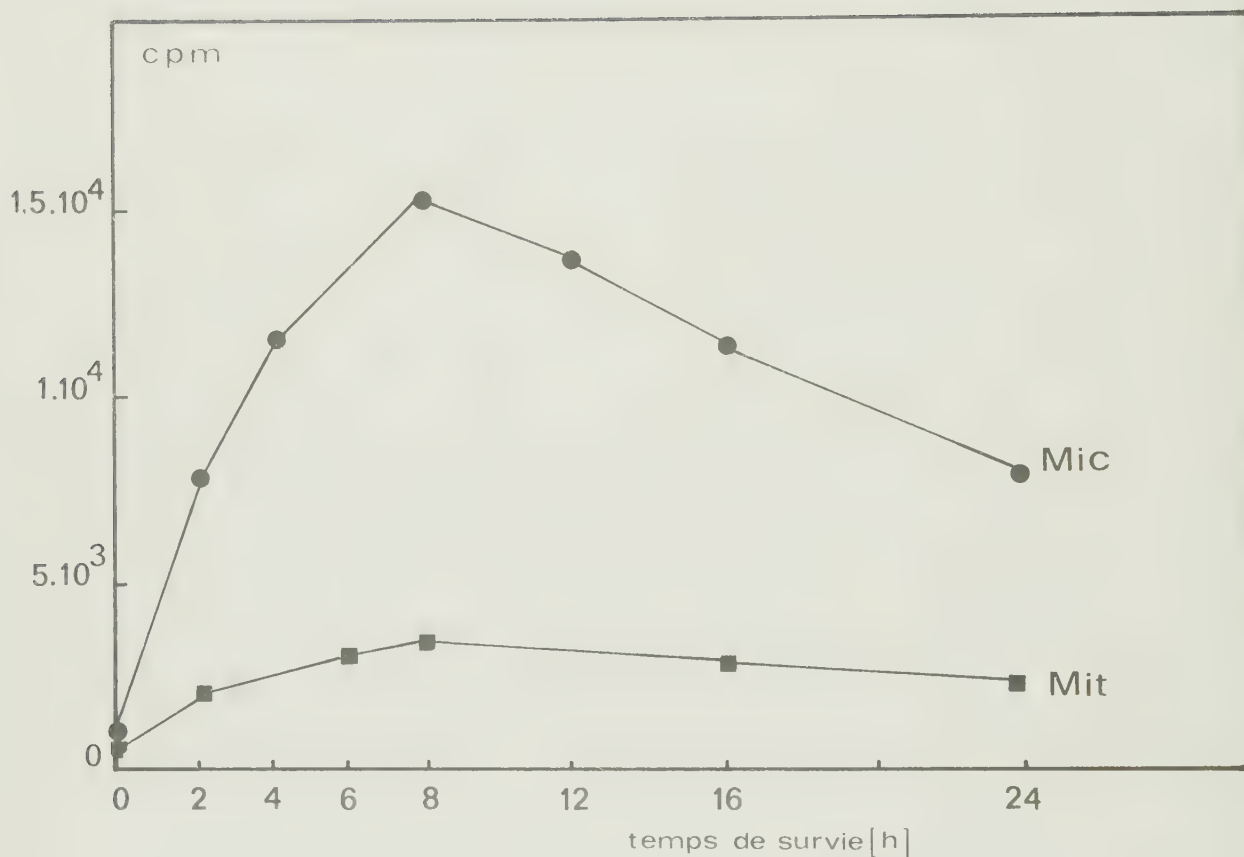


Fig. 21

Incorporation de (^3H)-leucine *in vivo* dans les microsomes (Mic.) et dans les mitochondries (Mit.) isolés de tissu maintenu en survie. Les radioactivités totales sont exprimées en cpm par 10 g de matière fraîche initiale.

DISCUSSION

La survie apparaît donc comme un moyen d'induire expérimentalement une synthèse active de protéines membranaires qui, en s'associant aux lipides, donnent sans doute des membranes fonctionnelles.

Cette stimulation des capacités de synthèse correspond bien aux augmentations des teneurs en protéines observées pendant la survie des tranches de tubercule de Pomme de terre ; de telles augmentations ont été signalées dans les culots microsomaux isolés : HACKETT et al. (1960) indiquent une élévation de 80% de la teneur en protéines, COTTE-MARTINON et al. (1969) trouvent que la teneur en protéines d'une fraction cellulaire recueillie par centrifugation à 20.000 g pendant 2 heures augmente après survie (79,5% d'augmentation).

L'accroissement de la teneur en protéines des culots mitochondriaux a été souvent signalé : HACKETT et al. (1960) trouvent 63% d'augmentation en étudiant des fractions brutes ; COTTE-MARTINON et al. (1969) signalent 34% d'augmentation dans les fractions mitochondriales purifiées sur rotor zonal. D'autres auteurs ont signalé ce même phénomène pour la Pomme de terre (VERLEUR, 1965) (LEE et CHASSON, 1966b) et pour la Patate douce (ASAHI et al., 1966) (ASAHI et MAJIMA, 1969) (SAKANO et ASAHI, 1969) (SAKANO et ASAHI, 1971 a et b) (LIPETZ, 1970).

Il est intéressant de signaler que les teneurs protéiques des culots mitochondriaux analysés par divers auteurs présentent une certaine homogénéité (*Tableau IX*) ; des différences existent toutefois : ainsi, pour les mitochondries purifiées, isolées de 10 g de matière fraîche initiale, les teneurs en protéines varient de 3,5 à 7,3 mg. Les culots bruts mitochondriaux contiennent davantage de protéines, les teneurs variant de 17,5 à 25,8 mg selon les auteurs. Cependant, quelle que soit la technique d'isolement des mitochondries, l'accord est unanime sur l'augmentation de la teneur en protéines des culots mitochondriaux après survie.

Est-ce que cet accroissement de la masse protéique de la fraction mitochondriale peut être dû à une contamination par les microsomes ? Dans nos propres expériences, nous pouvons écarter cette éventualité pour les raisons suivantes :

- les culots mitochondriaux étudiés ont été systématiquement purifiés sur gradient de saccharose.

TABLEAU IX

Teneurs en protéines de culots mitochondriaux isolés de tubercule de Pomme de terre ou de Patate douce (les teneurs protéiques sont exprimées en mg par 100 g de matière fraîche initiale).

AUTEURS	Matériel végétal	Organites	Tissu frais	Tissu survie	Augmentation
			mg/100g		
COTTE-MARTINON et al. (1969)	Pomme de terre	Mitochondries purifiées	10,4	13,9	34%
DUCET et al. (1969)		Mitochondries brutes	18,3	30,0	64%
" "		Mitochondries purifiées	7,3-10,0	—	—
VERLEUR (1965)		Mitochondries brutes	25,8	30,6	19%
LEE et CHASSON (1966)		Mitochondries brutes	20	40	100%
Présent travail		Mitochondries brutes	17,5	38,0	116%
		Mitochondries purifiées	3,5	6,4	83%
SAKANO et ASAHI (1971)	Patate douce	Mitochondries purifiées	6,8	12,1	78%

- les observations cytologiques ne révèlent pas la présence d'éléments contaminants importants non mitochondriaux.
- les réactions enzymatiques associées aux culots mitochondriaux n'indiquent pas une contamination appréciable.

Est-ce que cette augmentation de la teneur en protéines mitochondriales peut expliquer l'augmentation de l'intensité respiratoire observée au cours de la survie ? La réponse positive de LEE et CHASSON (1966b) et VERLEUR (1969) repose sur le fait que l'augmentation de la teneur en protéines et celle de l'intensité respiratoire sont à peu près parallèles, ce qui donne une intensité respiratoire (exprimée par rapport au mg de protéines) constante pendant la survie ; nous avons retrouvé cette relation dans nos premières expériences effectuées sur les fractions brutes ; dans les culots purifiés, une telle relation entre teneur en protéines et intensité respiratoire est moins évidente, et nous observons une augmentation de l'intensité respiratoire exprimée par rapport à la teneur en protéines pendant la survie, ce qui signifie qu'il se produit dans la mitochondrie même un changement des caractéristiques des oxydations respiratoires ; selon l'hypothèse de COTTE-MARTINON et al. (1969), des "super-mitochondries" existeraient dans les tissus en survie.

C - LIPIDES DES FRACTIONS CELLULAIRES.

Dans ces analyses, nous nous sommes spécialement attachés aux lipides membranaires.

1) Teneur en lipides du tubercule de Pomme de terre.

Le tubercule de Pomme de terre est pauvre en lipides ; la teneur en matière grasse s'élève à environ 0,6% du poids de matière sèche ou 0,12% du poids de matière fraîche, ce qui donne 1,2 mg de lipides bruts pour 1 gramme de tissu frais. GALLIARD (1968) trouve le même résultat. Après survie, en raison de l'entrée d'eau importante qui se produit dans les tissus, le pourcentage par rapport au poids frais final diminue. Mais il convient de préciser que la teneur en lipides, exprimée par rapport au poids frais initial, ne subit aucune modification.

TABLEAU X

Classes lipidiques présentes dans les fractions cellulaires ou dans le tissu entier du tubercule de Pomme de terre.

% lipides / lipides totaux

		Frais	Survie
MICROSOMES	Phospholipides	47	61,8
	Galactolipides	16,5	13,6
	Lipides neutres	36,5	24,6
MITOCHONDRIES PURIFIEES	Phospholipides	62,5	70,2
	Lipides neutres	35,1	26,4
TISSU	Phospholipides	35	36
	Galactolipides	28	28
	Composés stéroliques	12	12
	Lipides neutres	25	22

La teneur en lipides est très faible par rapport à un tissu oléagineux (l'Olive contient de 150 à 450 mg de lipides par g de matière fraîche). Ceci ne constitue pas une gêne en raison des techniques fines d'analyse qui sont maintenant à la disposition de l'expérimentateur. Bien mieux, on étudie plus facilement, sur un tissu pauvre en lipides, les lipides essentiels pour la vie de la cellule, sans être gêné par les lipides de réserve.

2) Classes de lipides.

a) Tissu entier.

La remarque que nous venons de faire se confirme lorsque nous examinons les principales classes de lipides présentes dans le tubercule : les phospholipides constituent la classe lipidique la plus importante (35% des lipides totaux) (*Tableau X*) ; or les phospholipides sont des constituants essentiels des membranes (MAZLIAK, 1971).

Les galactolipides sont abondants (28%) ; ce résultat, trouvé aussi par GALLIARD (1968), est surprenant parce que l'on sait que les galactolipides sont surtout des lipides présents dans les organes photosynthétiques, où ils sont les constituants des membranes chloroplastiques. Cependant, dans le cas du tubercule de Pomme de terre, il ne faut pas oublier la présence des plastes (amyloplast et jeunes plastes peu différenciés) ; on peut donc penser que les galactolipides sont associés aux membranes de ces plastes. On doit aussi se souvenir que le tubercule de Pomme de terre est l'équivalent d'une tige souterraine tubérisée, susceptible de verdier (LARSEN, 1950).

On note aussi la présence de composés stéroliques (mis en évidence par LEPAGE, 1968) et de lipides neutres (triglycérides).

b) Fractions cellulaires.

Les phospholipides sont les constituants lipidiques les plus importants des lipides totaux des fractions microsomales et mitochondriales

TABLEAU XI

Analyse qualitative et quantitative des lipides du parenchyme central de tubercule de Pomme de terre.

Abréviations : I : vapeur d'iode ; H_2 : pulvérisation H_2SO_4 à 50% ; Rh : Rhodamine 6G ; Dr : réactif de Dragendorff spécifique des lipides à choline et aussi des glycolipides ; Z : réactif de Zindzadze, spécifique du phosphore ; N : réactif ninhydrine, spécifique des lipides à fonctions amines ; ^{32}P : marquage au ^{32}P ; ClO_4H : aspersion d'acide perchlorique à 20% ; α : aspersion à l' α naphthol 0,5% puis aspersion à H_2SO_4 .

O : ocre ; BP : bleu pourpre ; BV : bleu violet ; V : violet ; Or : orange ; B : bleu ; J : jaune ; GR : gris rougeâtre ; R : rose.

S : stérols libres ; SL : Sulfolipide.

	IDENTIFICATION PAR REACTIONS COLOREES SPECIFIQUES									Produits de désacylation identifiés		
	I	H_2	Rh	Dr	Z	N	^{32}P	ClO_4H	α			
											RfX	RfY
PC	+	O	Or	+	+		+	+	O	GPC	0,95	0,58
PE	+	O	R		+	+	+	+	O	GPE	0,68	0,38
PI	+	O	B		+		+	+	O	GPI	0,09	0,23
PG	+	O	B	+	+		+	+	O	GPGz	0,35	0,54
DPG	+	O	B		+		+	+	O	GPGPG	0,11	0,47
PS	+	O	B		+	+	+	+	O	GPS	0,27	0,31
PA	+	O	B		+		+	+	O	GP	0,18	0,53
MGDG	+	BP	J	+				+	B			
DGDG	+	BP	J	+				+	B			
SL	+	BP	J					+	B			
ESG	+	BV	J					+(V)	V			
SG	+	BV	J					+(V)	V			
S	+	V	J					+(V)	V			
LN	+	O	B						O			

(Tableau X). Ils représentent 47 à 61,8% des lipides totaux mitochondriaux. Ces analyses sont à notre connaissance les premières concernant des fractions cellulaires végétales, mis à part un dosage préliminaire sur les lipides des mitochondries de Pomme (90% des lipides totaux sont des phospholipides) (BEN ABDELKADER, 1966) (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1965).

Les autres lipides présents dans les microsomes sont les lipides neutres et les galactolipides. La présence éventuelle de galactolipides dans les fractions microsomales ou mitochondriales est un problème qui a été rarement abordé jusqu'à présent. Nos propres observations montrent que les microsomes contiennent un pourcentage non négligeable de galactolipides ; les mitochondries purifiées sur gradient, par contre, ne contiennent pas de galactolipides, alors que les mitochondries brutes en contiennent. Nous en concluons que les galactolipides ne sont pas des constituants des membranes mitochondriales. Des expériences de BIALE et al. (1966) ont cependant abouti à des conclusions différentes ; selon ces auteurs, les mitochondries d'Avocat contiendraient des galactolipides dans les proportions de 6 moles de galactolipides pour 10 moles de phospholipides ; il est toutefois très difficile de séparer les mitochondries de fragments de chloroplastes contaminants dans un tissu vert.

La survie ne provoque pas de modifications importantes des proportions relatives des diverses classes lipidiques dans les mitochondries, mais elle augmente la richesse en phospholipides des microsomes. On peut donc conclure que la survie provoque une augmentation en masse des phospholipides des fractions cellulaires.

3) Catégories moléculaires de phospholipides.

L'importance respective de chaque phospholipide a été déterminée dans le tissu entier et les fractions cellulaires par diverses techniques : chromatographie sur papier silicé, sur couche mince, sur papier.

a) Tissu entier.

Nous avons mis en évidence dans l'extrait lipidique total 17

TABLEAU XII

Composition phospholipidique du tubercule de Pomme de terre.

	% des phospholipides totaux						
Phospholipide	PC	PE	PI	PG	DPG	PS	PA
Tissu frais	50	35	7	3	2	2	—
Tissu en survie	48	37	9	1	1	3	—

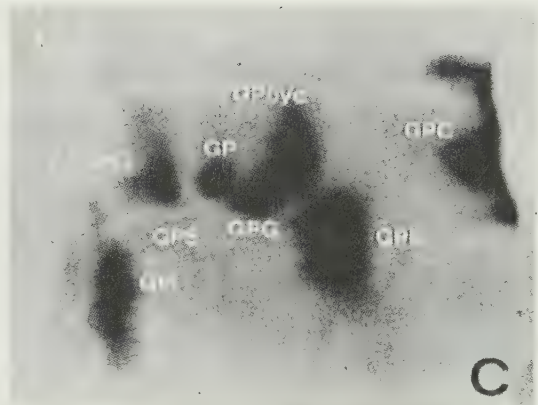
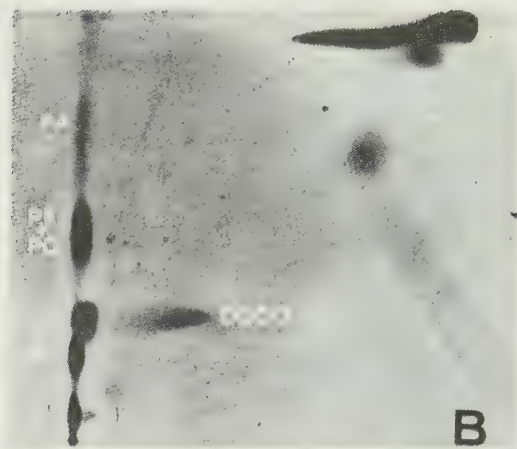
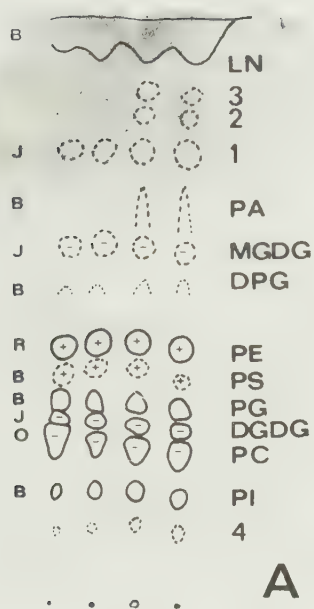


Fig. 22. Chromatographie sur papier silicé (A) et sur couche mince (GARDNER) (B) de l'extrait lipidique total et chromatographie sur papier (C) de l'extrait lipidique désacylé. Les conditions expérimentales sont expliquées dans le texte et dans le tableau XI.

composés qui ont été identifiés par réactions colorées spécifiques et par la détermination des valeurs de Rf en chromatographie (LEPAGE, 1964, 1968) (Tableau XI) (Fig. 22).

Les phospholipides pondéralement importants (Tableau XII) sont les phospholipides azotés à choline (phosphatidylcholine) et à éthanola- mine (phosphatidyléthanolamine). On note aussi la présence de phosphatidyl- inositol et de plus faibles quantités de phosphatidylglycérol, diphospha- tidylglycérol et phosphatidylsérine. L'acide phosphatidique est toujours présent en faibles quantités, ce qui signifie que les techniques d'extrac- tion que nous avons utilisées évitent l'attaque des phospholipides par les phospholipases (BENSON et STRICKLAND, 1960) (DOUCE, 1964) ; d'autre part, la faible activité phospholipasique D du tissu (QUARLES et DAWSON, 1969) évite la formation de phosphatidylméthanol (artéfact d'extraction signalé par DOUCE, 1964). Les identifications des phospholipides ont été vérifiées par la technique des produits de désacylation (DAWSON, 1967 ; DOUCE, 1964) (Fig. 22).

La composition phospholipidique du tubercule de Pomme de terre est analogue à celle d'autres tissus végétaux. Aucune modification quali- tative importante touchant les phospholipides n'accompagne la survie.

b) Fractions cellulaires.

Analyse qualitative

Les phospholipides les plus importants sont aussi les phospholi- pides azotés, phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine, qui repré- sentent respectivement plus de 60 et plus de 20% des phospholipides totaux (les déterminations du phosphore lipidique ou le dosage des acides gras donnent des valeurs très voisines). Les mitochondries contiennent, en outre, un pourcentage non négligeable de diphosphatidylglycérol (8% des phospho- lipides totaux) ; ce phospholipide n'existe qu'à l'état de traces dans les microsomes (Tableau XIII).

Si l'on compare les résultats que nous avons obtenus à ceux signalés dans d'autres fractions cellulaires, on trouve une remarquable homogénéité : les phospholipides azotés sont constamment les plus abondants ; la proportion de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine repré- sente au total 73 à 81% des phospholipides.

TABLEAU XIII

Composition phospholipidique des microsomes ou mitochondries des tranches de tubercule fraîches ou en survie. On a indiqué dans le tableau les pourcentages des phospholipides totaux ainsi que les masses de phospholipides présents dans les organites isolés de 100 g de matière fraîche initiale (en mg).

			PI	PC	PG	PS	PE	DPG	PA
MICROSOMES	Frais	%	10	62	1	1	23	1	2
		mg	1,49	7,13	0,1	0,3	2,88	0,1	0,2
	Survie	%	10,3	63,5	2,2	1	22	0,5	0,5
		mg	1,74	9,0	0,3	0,1	3,1	0,07	0,07
MITOCHONDRIES	Frais	%	7,0	43	3	3	30	8	5
		µg	35,5	219	15	15	153	40,8	25,5
	Survie	%	8	42	2	3	29	10	4
		µg	77	407	19	29	281	97	38

TABLEAU XIV

Teneur en phospholipides de quelques membranes d'origine animale ou végétale. Les teneurs sont exprimées en mg de phospholipide par mg de protéines.

TISSU	MITOCHONDRIES	MICROSOMES	REFERENCES
Foie de Rat	0,28	0,300-0,790	GETZ et al. (1962)
Foie de Cobaye	0,159	0,391	PARSONS et al. (1967)
Foie de Boeuf	0,123	0,675	ROUSER et al. (1968)
Chou-fleur	0,172	0,248	DOUCE (1970)
Pomme de terre	0,143-0,190	0,240-0,303	Présent travail

TABLEAU XV

Analyse des acides gras des lipides totaux du parenchyme central du tubercule de Pomme de terre.

(V'_R = volume de rétention corrigé)

Pourcentages des acides gras totaux. (%)

ACIDES GRAS	Abréviations	$\log V'_R$ mesuré	$\log V'_R$ témoin	Tissu frais %	Tissu survie %
Caprique	C ₁₀	1,15	1,10	traces	traces
Laurique	C ₁₂	1,51	1,50	0,5	1
Myristique	C ₁₄	1,76	1,74	1	2
Myristoléique	C _{14:1}	1,81	—	traces	traces
Palmitique	C ₁₆	0,00	0,00	14	14,5
Palmitoléique	C _{16:1}	0,05	0,06	1	1
Hexadécénoïque	C _{16:2}	0,12	—	traces	traces
Stéarique	C ₁₈	0,23	0,24	6,0	6,5
Oléique	C _{18:1}	0,28	0,28	4,5	4,0
Linoléique	C _{18:2}	0,35	0,34	53	51,2
Linolénique	C _{18:3}	0,44	0,43	17,5	18,5
Arachidique	C ₂₀	0,48	—	1,5	1

La survie ne provoque pas de modifications importantes des proportions respectives des phospholipides.

Teneur en phospholipides.

Après survie, on peut observer une augmentation significative de la teneur en phospholipides des culots microsomaux ou mitochondriaux par rapport aux teneurs notées dans les fractions provenant des tranches fraîches (*Tableau VII*). Ce résultat est parfaitement reproductible (*Tableau VIII*). Cette augmentation s'installe progressivement au cours de la survie. Dans le tableau XIV, on peut noter que les microsomes sont plus riches en phospholipides que les mitochondries (respectivement 303 et 143 µg de phospholipides pour 1 mg de protéines). Ce résultat est en excellent accord avec les données obtenues pour les mitochondries animales ou végétales.

L'enrichissement en phospholipides des culots microsomaux ou mitochondriaux, accompagnant les augmentations des teneurs protéiques de ces mêmes culots, suggère fortement une biogénèse de nouvelles membranes puisque les deux constituants majeurs de ces membranes sont synthétisés de pair. Les teneurs en phospholipides de ces culots microsomaux et mitochondriaux sont en bon accord avec les données recueillies sur les fractions isolées de tissus animaux ou de Chou-fleur. On retrouve dans les microsomes de tous ces tissus des teneurs plus élevées en phospholipides que dans les mitochondries de ces mêmes tissus (*Tableau XIV*). La teneur plus faible en phospholipides s'explique, pour les mitochondries, par la présence dans ces organites de matériel extra-membranaire alors que la fraction microsomale est constituée de matériel membranaire uniquement.

4) Composition en acides gras totaux.

a) Tissu entier.

Les acides gras les plus abondants du parenchyme central sont les acides saturés (*palmitique*) et les acides insaturés (*acides linoléique et linolénique*) (*Tableau XV*). L'acide *linoléique* (*diinsaturé*) est l'acide gras le plus abondant (plus de 50% des acides gras totaux). Les autres acides gras sont les acides *linolénique* (*triinsaturé*), *stéarique* (*saturé*), *oléique* et *palmitoléique* (*monoinsaturés*) : les acides gras insaturés représentent près

TABLEAU XVI

Composition en acides gras totaux des fractions cellulaires isolées de tissu frais (F) ou en survie (S).

		% des acides gras totaux						Masse acides gras mg /100g tissu
		C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
1500 g	F	22,5	Tr	4,5	2,1	50,4	14,3	0,235
	S	23,7	Tr	5,7	1,7	51,5	16,1	0,52
Mitochondries brutes	F	20	1,5	3,5	2	55	16	1,91
	S	22,5	—	5,5	3	49	19,5	3,20
Mitochondries purifiées	F	23	1,5	5	3,2	51,5	14	0,34
	S	25	0,5	6	2	52	13	0,685
Microsomes	F	21,4	Tr	7,8	2,1	48,3	20,4	7,1
	S	24,2	—	5,5	2,9	48,4	15,6	8,6
Surnageant cytoplasmique	F	18,9	Tr	8,5	9,6	42,2	20,7	0,748
	S	17,5	Tr	9,2	8,5	42,7	21,2	0,925

de 70% des acides gras totaux.

La composition du tubercule de Pomme de terre en acides gras est d'une remarquable stabilité pendant la conservation du tubercule, comme l'a montré CHERIF (1972).

La composition en acides gras que nous indiquons est en bon accord avec les déterminations de COTRUFO et LUNSETTER (1964), LE PAGE (1968), GALLIARD (1968), CHERIF et BEN ABDELKADER (1970).

La présence de l'acide *linoléique* confirme le caractère "hybride" du tubercule de Pomme de terre puisque cet acide gras est caractéristique des tissus photosynthétiques ; on peut ici aussi relier la présence de ce constituant à l'existence de structures plastidiales.

Notons que la survie n'entraîne pas de changements notables dans la proportion des acides gras, l'acide *linoléique* restant le plus abondant.

b) Fractions cellulaires.

Cette richesse en acides gras polyinsaturés se retrouve dans les mitochondries, microsomes ou les autres fractions cellulaires étudiées : les mêmes acides gras sont rencontrés et, en particulier, l'acide *linoléique* (Tableau XVI).

La similitude de composition entre les différentes fractions cellulaires est tout à fait remarquable (Fig. 23). On ne retrouve pas dans une fraction donnée une concentration spéciale d'un acide gras particulier ; on peut seulement noter des variations dans les pourcentages relatifs, les mitochondries semblant légèrement plus riches en acide *linoléique* que les microsomes. Cette homogénéité de composition en acides gras des différentes fractions cellulaires s'expliquera par la suite.

L'abondance en acides gras polyinsaturés a été signalée dans d'autres fractions cellulaires végétales : Pomme, Chou-fleur. Cependant, alors qu'il y a peu de différences de composition en phospholipides lorsque l'on passe d'une espèce à l'autre, on observe des variations importantes dans les proportions relatives des divers acides gras polyinsaturés présents. Ainsi les mitochondries de Chou-fleur sont riches en acide *linoléique*, les fractions mitochondriales de Lierre sont riches en acide *oléique*.

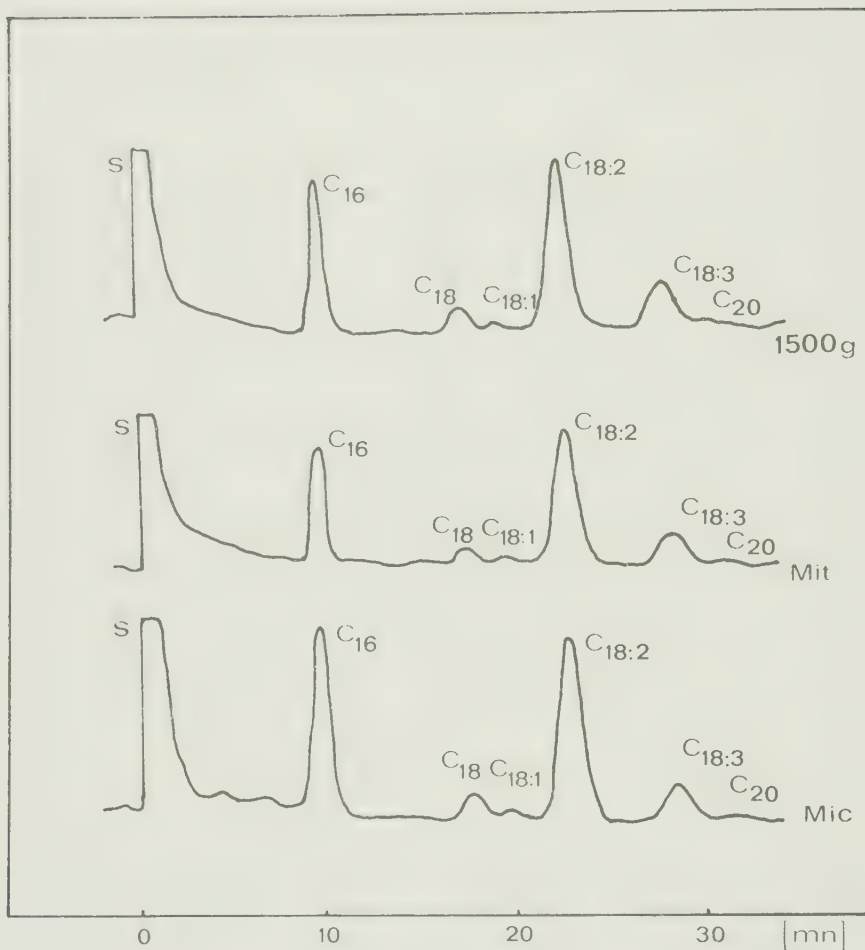


Fig. 23

Chromatographie en phase gazeuse des acides gras des fractions cellulaires isolées de tranches de tubercule fraîchement coupées.

1500 g = fraction recueillie par centrifugation à 1500 g/10 mn
Mit = mitochondries ; Mic = microsomes.

S représente le signal donné par l'enregistreur
Le temps de déroulement du chromatogramme est indiqué en mn.

La composition en acides gras des fractions cellulaires est peu affectée par la survie. Une augmentation en masse de tous les acides gras s'observe dans ces fractions isolées pendant la survie. Ceci confirme à nouveau que les membranes qui se forment ont les caractéristiques biochimiques habituelles des membranes cellulaires du tubercule de Pomme de terre.

5) Acides gras des catégories lipidiques.

a) Tissu entier.

Toutes les analyses ont montré que les phospholipides sont particulièrement riches en acide *linoléique* qui représente plus de 50% de la masse de leurs acides gras (Tableau XVII) ; on retrouve ce résultat après séparation des phospholipides par trois techniques différentes : chromatographie sur colonne d'acide silicique, de DEAE-cellulose ou chromatographie sur couche mince.

Parmi les différents phospholipides, il convient de distinguer deux grands groupes : les phospholipides basiques, tels la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine, qui contiennent d'importantes proportions d'acide *linoléique* (près de 60% des acides totaux) et les phospholipides acides, tels le phosphatidylinositol et le phosphatidylglycérol, qui sont plus saturés (55 à 60% des acides gras totaux ne contiennent pas de double-liaison). L'acide *linoléique* est surtout lié au monogalactosyldiglycéride ou au digalactosyldiglycéride. Les résultats de ces analyses sont en bon accord avec les données de GALLIARD (1968) et LEPAGE (1968) sur le tubercule de Pomme de terre ou avec les indications de NICHOLS et JAMES (1964) sur le bulbe de Narcisse.

Toutes ces analyses montrent que les galactolipides des tubercules ou des bulbes sont caractérisés par leur richesse en acide *linoléique* et en acide *linoléique*, alors que les galactolipides des tissus photosynthétiques sont plus riches en acide *linoléique*.

b) Fractions cellulaires.

Nous avons analysé la composition en acides gras des phospho-

TABLEAU XVII

Analyse des acides gras des classes lipidiques du tissu entier (on a indiqué les pourcentages des acides gras totaux).

	% des acides gras totaux				
	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Lipides totaux	17,2	5,1	4,1	<u>55,0</u>	<u>18,5</u>
Phospholipides	23,5	4,4	3,0	<u>55,0</u>	13,8
D G D G	16,4	8,5	8,8	44,5	21,6
M G D G	5,7	7,0	11,5	27,3	<u>48,4</u>
Lipides neutres	27,6	8,5	11,3	27,3	12,9
P C	33,5	8,0	6,0	47,5	4,7
P E	32,6	8,4	8,5	46,7	3,7
P I	45,4	9,9	10,9	29,2	0,5
P G	52,3	8,5	9,7	25,5	2,1

lipides, des microsomes et des mitochondries isolées de tranches fraîches ou des tranches en survie. Les caractéristiques, révélées par l'analyse des acides gras du tissu, se retrouvent globalement (*Tableau XVIII*).

- la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine sont riches en acide *linoléique* (45 à 54,3% des acides totaux)
- les acides saturés, et notamment l'acide *palmitique*, sont abondants dans les phospholipides acides (phosphatidylinositol et phosphatidylglycérol)
- on note en plus la grande abondance d'acides insaturés dans le diphosphatidylglycérol des mitochondries.

La survie ne modifie pas les proportions relatives des acides gras dans les phospholipides des fractions cellulaires.

DISCUSSION

Les données obtenues sont en bon accord avec les premiers résultats obtenus dans les fractions cellulaires végétales (mitochondries et microsomes de parenchyme de Pomme). Récemment DEVOR et MUDD (1971b) viennent de publier des compositions en acides gras de la phosphatidylcholine de diverses espèces végétales et en particulier de feuilles d'Epinard : une abondance en acides polyinsaturés est observée.

Il est surprenant de constater la pauvreté des données concernant la nature des acides gras liés aux phospholipides des membranes végétales, alors que de récents travaux sur les propriétés biophysiques des phospholipides (CHAPMAN et WALLACH, 1968) (LUZZATI et al., 1968) (CHAPMAN et LESLIE, 1970) ont montré que la composition en acides gras pouvait contrôler la fluidité membranaire et l'activité de ces membranes. CHAPMAN et WALLACH (1968) s'inspirent des données biophysiques et de faits expérimentaux ; ils ont comparé notamment la composition en acides gras de mitochondries de foie d'animaux poikilothermes (poissons, par exemple) et d'animaux homéothermes (Rat) : la proportion en acides gras polyinsaturés est nettement plus élevée chez les premiers. Les auteurs supposent donc que la présence de ces acides insaturés rend possible le fonctionnement des systèmes enzymatiques à plus basse température : l'organisme réagirait à un abaissement de température par une insaturation des acides gras des chaînes phospholipidiques. Ce phénomène est bien connu chez les végétaux

TABLEAU XVIII

Analyse des acides gras des phospholipides des mitochondries ou des microsomes isolés de tissu frais ou en survie (% des acides gras totaux) (F = frais ; S = survie).

		% des acides gras totaux							
		PC		PE		PI		DPG	
		F	S	F	S	F	S	F	S
M I T O C H O N D R I E S	C ₁₆	20,3	25,6	21,5	22,1	55,2	53,5	15,7	14,0
	C ₁₈	5,6	5,2	9,5	8,4	8,5	9,5	7,8	8,3
	C _{18:1}	8,7	3,6	6,2	7,9	4,2	4,9	9,5	9,0
	C _{18:2}	<u>50,3</u>	<u>54,3</u>	<u>52,5</u>	<u>51,3</u>	<u>25,7</u>	<u>24,2</u>	<u>48,2</u>	<u>49,5</u>
	C _{18:3}	6,5	11,3	3,4	10,3	1,5	3,4	14,3	15,1
M I C R O S O M E S	C ₁₆	32,2	31,5	29,2	30,5	58,6	55,7	53,2	52,5
	C ₁₈	10,7	11,2	7,5	6,5	8,3	10,5	9,2	10,7
	C _{18:1}	5,5	4,6	2,4	5,3	3,3	4,7	10,5	11,3
	C _{18:2}	<u>46,6</u>	<u>45,0</u>	<u>49,4</u>	<u>48,0</u>	<u>26,7</u>	<u>25,0</u>	<u>25,5</u>	<u>22,3</u>
	C _{18:3}	5,0	6,3	9,1	8,5	2,5	2,0	1,0	2,0

qui accumulent des acides gras polyinsaturés à basse température (MAZLIAK, 1968). Par exemple, URITANI et YAMAKI (1969), constatant que les mitochondries de la Patate douce, plante tropicale, sont caractérisées par une composition en acides gras plus pauvre en acides insaturés que les mitochondries de Pomme de terre, plante de climats tempérés, provoquent un accroissement de la proportion en acides insaturés en conservant la Patate douce à température basse.

D - CONCLUSIONS.

La biogénèse de membranes intracellulaires, suggérée par les observations microscopiques, est fortement confirmée par les analyses biochimiques.

Ainsi, une augmentation importante de la masse des protéines ou des phospholipides est observée dans les culots de microsomes ou de mitochondries. Ce résultat est en quelque sorte l'image biochimique de la biogénèse des membranes ; la valeur de ces données est renforcée par les nombreuses études cytologiques et enzymatiques, qui ont établi la pureté satisfaisante des fractions cellulaires analysées, leur richesse en membranes ainsi que l'intégrité de ces membranes.

Les membranes nouvellement synthétisées ont une composition phospholipidique et une composition en acides gras identiques à celle des membranes préexistantes. Le fait que tous les phospholipides augmentent en masse au même rythme pendant la survie est une donnée importante. Ces analyses nous montrent donc que les membranes qui se forment au cours de la survie ont des caractéristiques biochimiques habituelles.

Leur composition lipidique se caractérise par la richesse en phospholipides, la présence abondante de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine (et de diphosphatidylglycérol dans les mitochondries), l'importance des acides polyinsaturés (acides *linoléique* et *linoléinique*) et l'insertion préférentielle des molécules d'acide *linoléique* dans les phospholipides.

Si la biogénèse des membranes microsomales est évidente d'après les observations cytologiques *in situ*, la biogénèse des membranes mitochondriales semble moins importante et cette biogénèse se décèle mieux par les

dosages *in vitro*, après isolement des fractions cellulaires ; l'augmentation de la teneur en constituants lipidiques et protéiques mitochondriaux pourrait correspondre à plusieurs phénomènes :

- addition à la mitochondrie de constituants lipidiques et protéiques non insérés dans les membranes
- développement des crêtes mitochondriales
- apparition de nouvelles mitochondries (VAN STEVENINCK et VAN STEVENINCK, 1969).

Chacun des processus pourrait intervenir dans l'augmentation en masse du matériel mitochondrial. Nous savons, par exemple, qu'il existe des mitochondries de type "jeune" à crêtes peu développées, abondantes dans les tissus jeunes, et les mitochondries de type "adulte" avec crêtes bien développées, apparaissant pendant la différenciation des tissus (BUVAT et LANCE, 1958 ; CHRISPEELS et al., 1966) ; de même on distingue dans certaines grenouilles, des mitochondries de type "hivernal" (crêtes parallèles à la membrane externe) et de type "estival" (crêtes perpendiculaires) (KARNOVSKY, 1963). Tout ceci montre la grande mobilité des structures internes mitochondriales qui sont le reflet de l'activité de la mitochondrie, un peu comme le développement du réticulum endoplasmique est le reflet de la synthèse protéique dans la cellule végétale.

Cependant même si une biogénèse de matériel mitochondrial peut être envisagée, il n'est pas sûr que ces nouveaux éléments présentent une activité physiologique immédiatement élevée ; la mise en place des divers éléments du "puzzle" constituant les chaînes d'enzymes indispensables peut être arrêtée par l'approvisionnement faible en un des maillons de la chaîne. Il pourrait donc exister dans les tissus en survie des mitochondries pleinement fonctionnelles et d'autres moins actives. Ce processus ne serait pas une exclusivité de la survie de tranches de Pomme de terre : ainsi, dans les cultures de la levure placées en anaérobiose, PLATTNER et SCHATZ (1969) ont mis en évidence des "promitochondries" d'aspect identique aux mitochondries normales, mais privées de chaîne respiratoire fonctionnelle (CRIDDLE et SCHATZ, 1969) ; NEAL et al. (1971) ont montré que dans les cultures remises en aérobiose (déréprimées) coexisteraient les deux types de mitochondries "réprimées" et "déréprimées".

Quelle que soit l'interprétation à donner à l'augmentation du matériel mitochondrial, il reste incontestable qu'une biogénèse des

constituants lipidiques membranaires - et surtout des membranes du réticulum endoplasmique - se produit pendant la survie. Comment s'effectue la synthèse des lipides attachés à ces nouvelles membranes ? Observe-t-on une exaltation des synthèses au niveau des membranes néoformées elles-mêmes ? Nous allons tenter de répondre à ces deux questions dans le prochain chapitre.

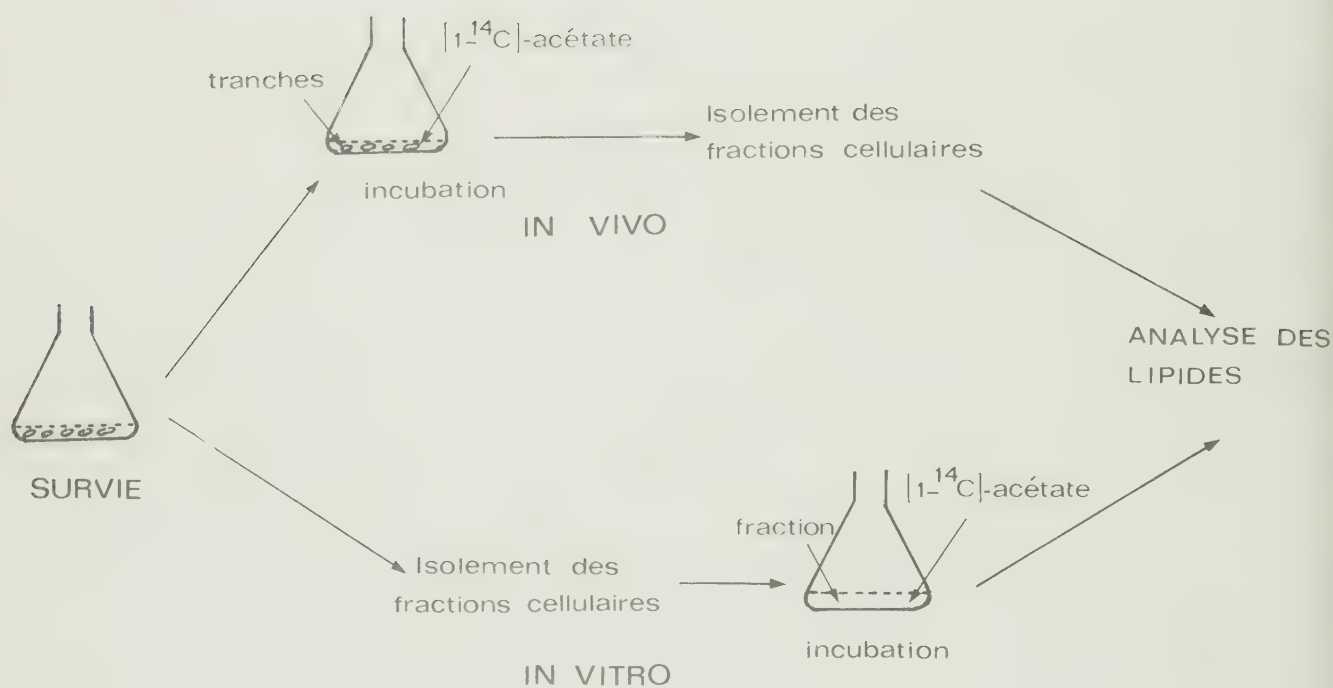


Fig. 24

Techniques de fourniture des précurseurs radioactifs aux tranches et aux fractions cellulaires du tubercule de pomme de terre.

IV - BIOSYNTHESE DES LIPIDES

MEMBRANAIRES

Les dosages biochimiques ont montré qu'il se produisait pendant la survie une augmentation de la teneur en protéines et en lipides des fractions cellulaires. Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle ces augmentations de masse correspondent à l'apparition de constituants néoformés dans les fractions cellulaires, nous avons suivi, en cours de survie, la biosynthèse des lipides à l'aide de précurseurs radioactifs. Cela devait nous permettre de suivre l'insertion des lipides nouvellement synthétisés dans les différentes régions cellulaires et notamment dans les membranes. Par ailleurs nous nous sommes efforcés de localiser à l'intérieur de la cellule les sites de biosynthèse des lipides membranaires.

Deux approches ont été utilisées (Fig. 24)

- la première, *in vivo*, consiste à mettre les tranches de tissu en présence du précurseur. A la fin de l'incubation, les tranches sont abondamment rincées et les fractions cellulaires sont isolées selon les techniques habituelles. Grâce à cette méthode, nous pouvons suivre l'accumulation des lipides nouvellement synthétisés dans les fractions laissées dans l'environnement cellulaire normal.

- la deuxième approche, *in vitro*, consiste à isoler préalablement la fraction cellulaire, puis à la mettre en incubation dans une solution du précurseur radioactif. Nous pouvons ainsi suivre la capacité de biosynthèse des fractions cellulaires isolées du reste de la cellule.

Nous allons examiner les résultats que donne l'application de ces deux méthodes sur les fractions cellulaires des tranches de tissu frais ou en survie.

A - ETUDE IN VIVO.

Nous effectuons les expériences sur des tranches fraîchement coupées, des tranches maintenues préalablement 24 heures en survie et dans des tranches en cours de survie.

TABLEAU XIX

Influence de la survie sur la biosynthèse des lipides dans le parenchyme de tubercule de Pomme de terre.

Les intensités de biosynthèse sont exprimées en cpm par gramme de matière fraîche initiale, en nanomoles de précurseur incorporées dans les lipides, en % de (1-¹⁴C)-acétate fourni ou encore en % de 1'(1-¹⁴C)-acétate entré dans le tissu.

Temps de survie	ENTREE DU PRECURSEUR	INCORPORATION DU PRECURSEUR DANS LES LIPIDES			
	% du précurseur effectivement entré dans le tissu	Radioactivité des lipides (cpm.g ⁻¹)	% du précurseur fourni	% du précurseur entré dans le tissu	nanomoles de précurseur incorporées dans les lipides
0 h	41,6	$3,8 \cdot 10^5$	1,6	3,8	12
10 h	42	$24 \cdot 10^5$	10	22,2	64
24 h	41	$8,3 \cdot 10^5$	4,1	10	27

1) Intensité des synthèses lipidiques au cours de la survie.

a) Tissu entier.

Lorsque des lots identiques de tranches de tubercule sont placés en survie pendant des temps variables (de 0 à 24 heures) et mis en incubation pendant une heure dans une solution d'($1-^{14}\text{C}$)-acétate de sodium, on observe une augmentation appréciable de la radioactivité des lipides totaux des tissus. Cette stimulation du marquage des lipides présente un maximum à la 10ème heure de survie.

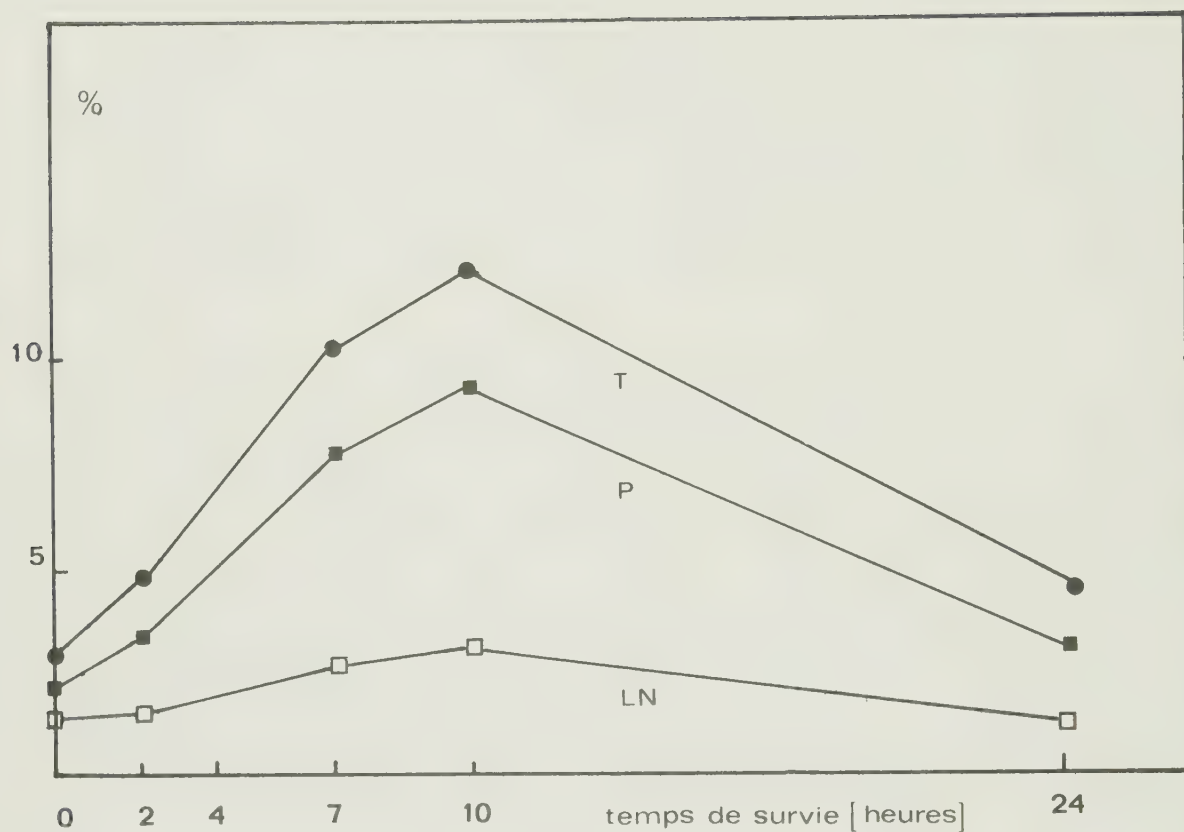
La radioactivité incorporée par unité de temps et pour un même poids de matière fraîche initiale (ou pour un nombre de disques constant) est 7 à 8 fois plus importante après 10 heures de survie que dans le tissu frais - Après 24 heures de survie, l'augmentation est encore de 300 à 400% (Tableau XIX) (Fig. 25).

Pour interpréter ces résultats, on peut d'abord supposer une perméabilité accrue des membranes cellulaires au précurseur radioactif après un certain temps de survie, ce qui entraînerait le plus grand marquage des lipides (Nous avons signalé, par exemple, l'absorption plus importante du phosphore après 24 heures de survie). Mais nous avons constaté que l'absorption du précurseur ($1-^{14}\text{C}$)-acétate n'est pas augmentée par la survie : en mesurant la radioactivité du milieu d'incubation où ont baigné des rondelles fraîches, nous trouvons que la radioactivité du milieu a diminué de 41,6% en une heure ; après survie, la même diminution est notée (41 à 45%). Ce résultat nous indique que l'intensité d'absorption du précurseur par les cellules est la même avant ou après survie. La stimulation de l'incorporation de l'acétate dans les lipides correspond donc à une réelle stimulation des synthèses.

Ces résultats confirment les premières expériences de WILLEMOT et STUMPF (1967a) qui ont découvert ce phénomène caractéristique de la survie.

b) Fractions cellulaires.

Nous avons recherché dans quelles fractions cellulaires se retrouvent les lipides synthétisés en cours de survie.



				75 %
Phosph.	51	72	76	
L.N	49	28	24	25 %

Fig. 25

Influence du temps de survie sur l'incorporation de l'acétate marqué dans les lipides totaux (T) , les phospholipides (P) et les lipides neutres (LN) de 2 g de tranches de tubercule. Le précurseur est fourni pendant deux heures.

L'incorporation de l'acétate radioactif est exprimée en % de la quantité de précurseur fournie, incorporé dans les lipides. De plus, en bas du graphique, on a indiqué les pourcentages de la radioactivité des lipides totaux, retrouvés dans les phospholipides et dans les lipides neutres.

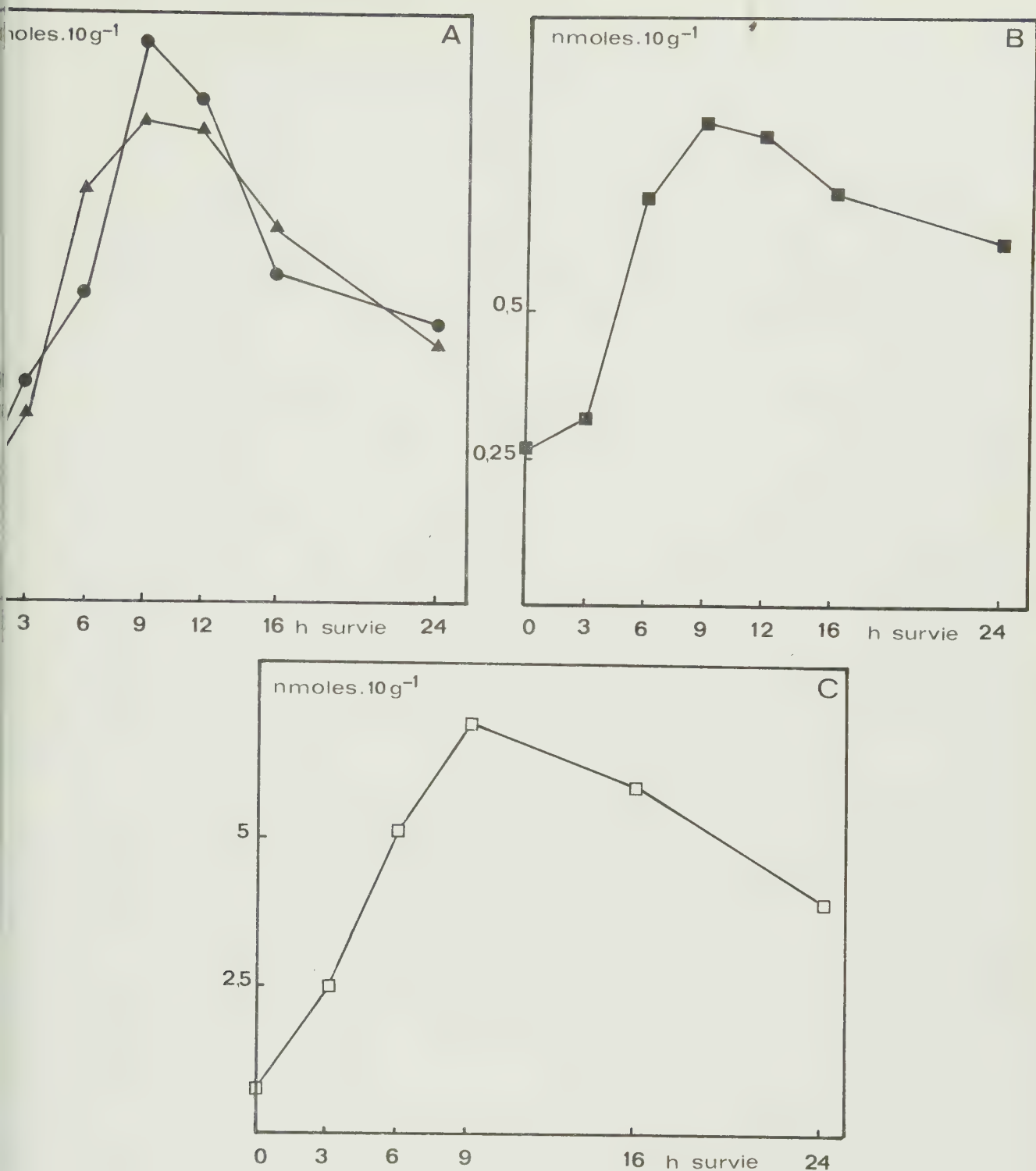


Fig. 26

Influence de la survie sur l'incorporation de l'acétate marqué *in vivo* dans les lipides totaux des macrosomes (A) ou des mitochondries (B) et dans les acides gras totaux des microsomes (C). On a indiqué en ordonnée les nanomoles de précurseur incorporées en une heure et pour les fractions cellulaires isolées de 10 g de tissu(matière fraîche initiale). Les temps de survie sont indiqués en heures.

TABLEAU XX

Incorporation de l'(1-¹⁴C)-acétate de sodium dans les lipides totaux des fractions cellulaires isolées de tranches de tubercules maintenues en survie.

Les radioactivités totales des lipides sont exprimées en nanomoles de précurseur incorporées par mg de protéine et par heure.

TEMPS DE SURVIE	0 h	9 h	24 h
Microsomes	0,35	1,70	0,76
Mitochondries	0,14	0,68	0,30
Surnageant	0,015	0,014	0,010

b₁ - Comparaison entre tranches fraîches et tranches en survie depuis 24 heures.
.....

Le tableau XX montre que l'incorporation de l'acétate radioactif dans les lipides des microsomes est beaucoup plus élevée dans les tranches en survie depuis 24 heures que dans les tranches de tissu frais ; la radioactivité des lipides microsomaux est doublée quand on exprime les résultats par rapport au poids de matière fraîche ; cette stimulation est encore plus nette dans des temps plus courts de survie.

On observe également une augmentation de la radioactivité des lipides mitochondriaux (exprimée par rapport à la quantité d'organites isolée d'un même poids initial de matière fraîche) ; la radioactivité totale des lipides mitochondriaux est constamment plus faible que celle des lipides microsomaux, ce qui s'explique en partie par la faible importance pondérale du pool lipidique mitochondrial ; par contre, quand on exprime la radioactivité des lipides des mitochondries par rapport à la masse des protéines, on obtient des résultats du même ordre de grandeur que pour les microsomes, mais plus faibles cependant : 35.000 cpm/mg pour les mitochondries et 73.600 cpm/mg pour les microsomes.

Dans le surnageant cytoplasmique, on ne retrouve pas une telle augmentation de la radioactivité des lipides ; au contraire ce compartiment semble contenir relativement moins de lipides radioactifs après survie. Une diminution de la radioactivité des lipides exprimée par rapport au mg de protéines s'observe après 24 heures de survie ; en raison de l'importante masse protéique présente dans le surnageant cytoplasmique, la radioactivité spécifique des lipides (exprimée par rapport au poids des protéines) est très faible.

b₂ - Variation des capacités de biosynthèse au cours de la survie.
.....

Au cours de la survie, nous observons une augmentation régulière de la radioactivité des lipides des microsomes et des mitochondries (*Fig. 26*). Le maximum de l'intensité du marquage s'observe 9 heures après le début du maintien en survie, c'est-à-dire au moment de la stimulation maximum des synthèses de lipides dans le tissu entier. L'augmentation du marquage est considérable : 585% par rapport au tissu frais dans les microsomes. Après

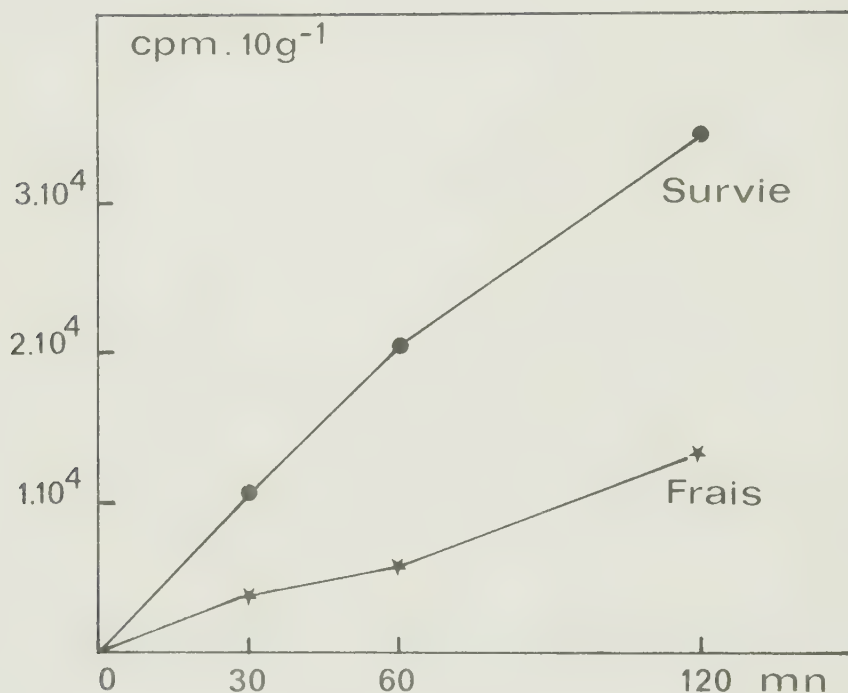


Fig. 27
Incorporation de l'acétate marqué in vivo
dans les lipides totaux des microsomes de tranches
fraîches (Frais) ou en survie (survie).

Sont indiqués en abscisse les temps
de mise en incubation des tranches dans la solution
radioactive(en mn) et en ordonnée, les radioactivi-
tés des lipides, en cpm pour des culots recueillis à
partir de 10 g de matière fraîche initiale.

le maximum, on observe une décroissance lente de la radioactivité des lipides ; celle-ci reste cependant à un niveau plus élevé que dans le tissu frais après 24 heures de survie (*Tableau XX*).

Une telle évolution des synthèses au cours de la survie a été retrouvée dans de nombreuses expériences. Ce résultat est en accord avec les données de WILLEMOT et STUMPF (1967a) sur le tissu entier et des résultats récents de CASTELFRANCO et al. (1971) sur les fractions membranaires.

Nous avons d'ailleurs vérifié que les capacités de synthèse des lipides membranaires augmentent dans les cellules en survie en réalisant l'expérience suivante. Des tranches de tubercule, fraîches ou après survie de 24 heures, sont mises en incubation dans une solution d'(1-¹⁴C)-acétate. Après 30, 60 ou 120 mn, des tranches sont prélevées et rincées ; les microsomes contenus dans ces tranches sont préparés, les lipides en sont extraits et la radioactivité de ces lipides est mesurée. On note une augmentation linéaire de la radioactivité des lipides microsomaux, avant ou après survie, mais l'augmentation est beaucoup plus rapide après survie, ce qui traduit une plus forte capacité de synthèse des lipides microsomaux par les cellules (*Fig. 27*).

b₃ - Comparaison des capacités de biosynthèse à partir de différents précurseurs.

Pour compléter les résultats obtenus avec 1'(1-¹⁴C)-acétate, nous avons suivi l'incorporation d'autres précurseurs radioactifs dans les lipides des cellules. Les expériences étaient cependant compliquées par le fait que la survie modifie la perméabilité des cellules à diverses molécules, comme les phosphates, le glycérol ou la choline. Pour comparer valablement les capacités de biosynthèse des tissus frais et des tissus en survie, la seule solution consiste à *exprimer la radioactivité des lipides par rapport à la radioactivité totale prélevée*.

Le tableau XXI montre que, quel que soit le précurseur utilisé, on observe une augmentation du pourcentage de radioactivité incorporée dans les lipides après 12 heures de survie, ce qui indique avec certitude qu'il s'agit d'une synthèse totale de molécules lipidiques complètes et non, comme pourraient le suggérer les résultats obtenus avec 1'(1-¹⁴C)-acétate,

TABLEAU XXI

*Incorporation des précurseurs in vivo dans les lipides
microsomaux de tissu frais ou de tissu en survie.*

	% de nanomoles incorporées dans les lipides par rapport aux nanomoles entrées dans le tissu		
	FRAIS	SURVIE	Rapport Frais/Survie
(1- ¹⁴ C)-acétate	1,9	12	6,3
(³² P)-phosphate	2,1	6,3	3
(1- ¹⁴ C)-glycérol	0,4	1,5	3,75
(Me- ¹⁴ C)-choline	2,0	3,2	1,6

d'une synthèse d'acides gras uniquement. On peut cependant observer que l'augmentation des synthèses est retrouvée le plus nettement avec l'acétate, ce qui s'explique, d'une part, par le grand nombre de molécules de précurseurs nécessaires pour synthétiser une seule molécule d'acide gras en C_{16} ou C_{18} et d'autre part, par l'existence d'au moins deux restes d'acides gras par molécule lipidique brute. Dans ces conditions, nous avons largement utilisé l'(1- ^{14}C)-acétate dans la suite de ce travail.

2) Nature des lipides synthétisés.

En mettant en oeuvre plusieurs techniques chromatographiques : chromatographie sur papier silicé, sur couche mince, etc... nous avons cherché à savoir quelles catégories lipidiques étaient le plus activement synthétisées au cours de la survie.

a) Tissu entier.

Nous avons montré assez tôt (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1968 ; BEN ABDELKADER, 1968) que l'augmentation de la synthèse des lipides intéressait surtout les phospholipides (*Fig. 25*) ; en effet, après marquage à l'(1- ^{14}C)-acétate des tranches de tissu fraîches, 51% de la radioactivité totale des lipides se retrouve dans les phospholipides ; après survie, ce pourcentage augmente jusqu'à 76% ; la radioactivité totale des phospholipides est 9 fois plus importante après 10 heures de survie, alors que celle des lipides neutres augmente moins.

Ce résultat, confirmé par WEN JING TANG et CASTELFRANCO (1968), montre que les synthèses qui se développent en cours de survie intéressent des *constituants lipidiques fondamentaux des membranes*. Par comparaison, la survie de disques de Pomme (GALLIARD et al., 1968), s'accompagne de l'exaltation de la biosynthèse des lipides neutres et des acides gras libres, ce qui montre que les phénomènes observés sont différents.

TABLEAU XXII

Pourcentages de radioactivité totale retrouvés dans les catégories moléculaires lipidiques de fractions cellulaires isolées de tranches fraîches et de tranches en survie, après 1 h d'incubation *in vivo* en présence d'acétate-1-¹⁴C.

		MITOCHONDRIES				MICROSOMES			
		FRAIS		SURVIE		FRAIS		SURVIE	
		%	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm
P h o s p h o l i p i d e s	PI	13,0	546	9,3	1.650	9,3	15.020	11,5	90.800
	PC	<u>41,0</u>	<u>1.720</u>	<u>43,6</u>	<u>7.720</u>	<u>38,6</u>	<u>59.500</u>	<u>38,4</u>	<u>303.500</u>
	PG	26,8	1.125	13,3	2.370	33,8	52.101	26,4	208.500
	PS	1,2	50	1,0	177	0,5	806	0,9	7.100
	PE	<u>13,1</u>	<u>550</u>	<u>26,8</u>	<u>4.750</u>	<u>11,5</u>	<u>18.580</u>	<u>18,4</u>	<u>145.200</u>
	PA	2,2	92	2,0	354	1,1	1.770	1,5	11.850
	DPG	1,1	46	2,6	460	2,1	3.400	2,7	21.300
Total		98,4	4.129	98,6	17.481	96,9	151.177	99,8	788.250
Phospholi- pides totaux		32,0	4.200	55	17.710	42,5	161.500	58	790.000
MGDG		2,1	275	4,2	1.352	1,2	4.660	1,5	20.400
DGDG		0	0	0	0	0	0	0	0
ESG		1,1	144	3,1	998	1,4	5.310	2,7	36.700
Lipides neutres		64,7	8.480	37,7	12.139	54,9	151.500	37,8	515.000
Lipides totaux		99,9	13.099	100	32.199	100	322.970	100	1362.100

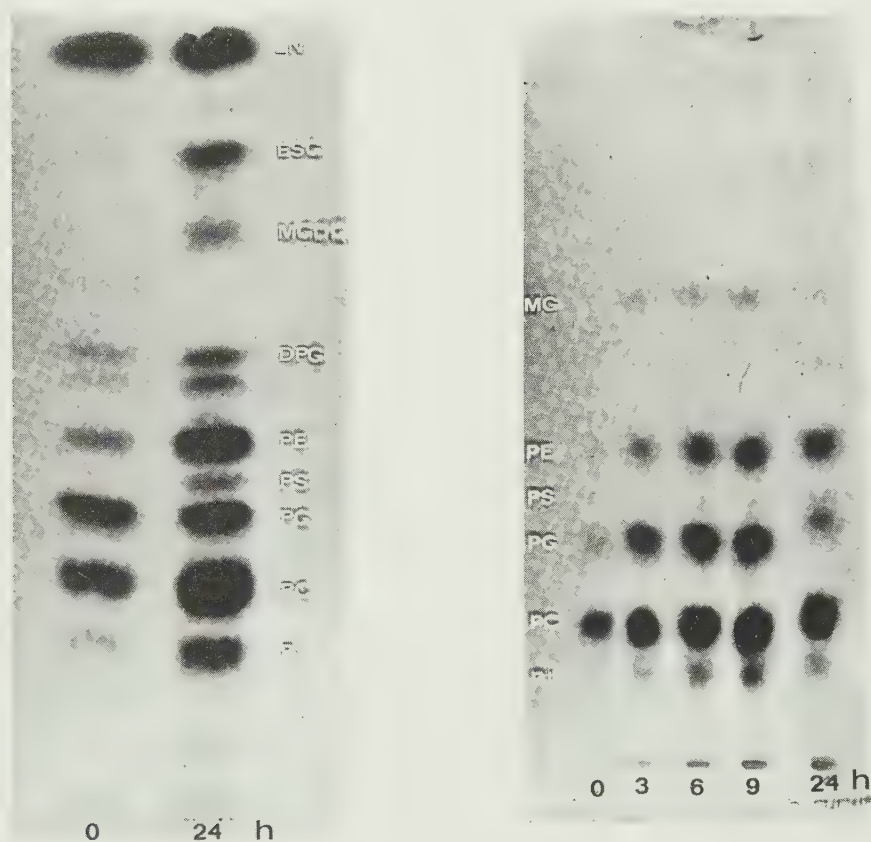


Fig. 28. Incorporation de l'acétate marqué in vivo dans les lipides des microsomes isolés de tranches de tissu maintenues en survie. Les temps de survie sont indiqués en heures. L'extrait lipidique total est analysé par chromatographie sur papier silicé. Les chromatogrammes sont autoradiographiés sur film Kodirex.

TABLEAU XXII

Pourcentages de radioactivité totale retrouvés dans les catégories moléculaires lipidiques de fractions cellulaires isolées de tranches fraîches et de tranches en survie, après 1 h d'incubation *in vivo* en présence d'acétate-1-¹⁴C.

		MITOCHONDRIES				MICROSOMES			
		FRAIS		SURVIE		FRAIS		SURVIE	
		%	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm
P h o s p h o l i p i d e s	PI	13,0	546	9,3	1.650	9,3	15.020	11,5	90.800
	PC	<u>41,0</u>	<u>1.720</u>	<u>43,6</u>	<u>7.720</u>	<u>38,6</u>	<u>59.500</u>	<u>38,4</u>	<u>303.500</u>
	PG	26,8	1.125	13,3	2.370	33,8	52.101	26,4	208.500
	PS	1,2	50	1,0	177	0,5	806	0,9	7.100
	PE	<u>13,1</u>	<u>550</u>	<u>26,8</u>	<u>4.750</u>	<u>11,5</u>	<u>18.580</u>	<u>18,4</u>	<u>145.200</u>
	PA	2,2	92	2,0	354	1,1	1.770	1,5	11.850
	DPG	1,1	46	2,6	460	2,1	3.400	2,7	21.300
Total		98,4	4.129	98,6	17.481	96,9	151.177	99,8	788.250
Phospholi- pides totaux		32,0	4.200	55	17.710	42,5	161.500	58	790.000
MGDG		2,1	275	4,2	1.352	1,2	4.660	1,5	20.400
DGDG		0	0	0	0	0	0	0	0
ESG		1,1	144	3,1	998	1,4	5.310	2,7	36.700
Lipides neutres		64,7	8.480	37,7	12.139	54,9	151.500	37,8	515.000
Lipides totaux		99,9	13.099	100	32.199	100	322.970	100	1362.100

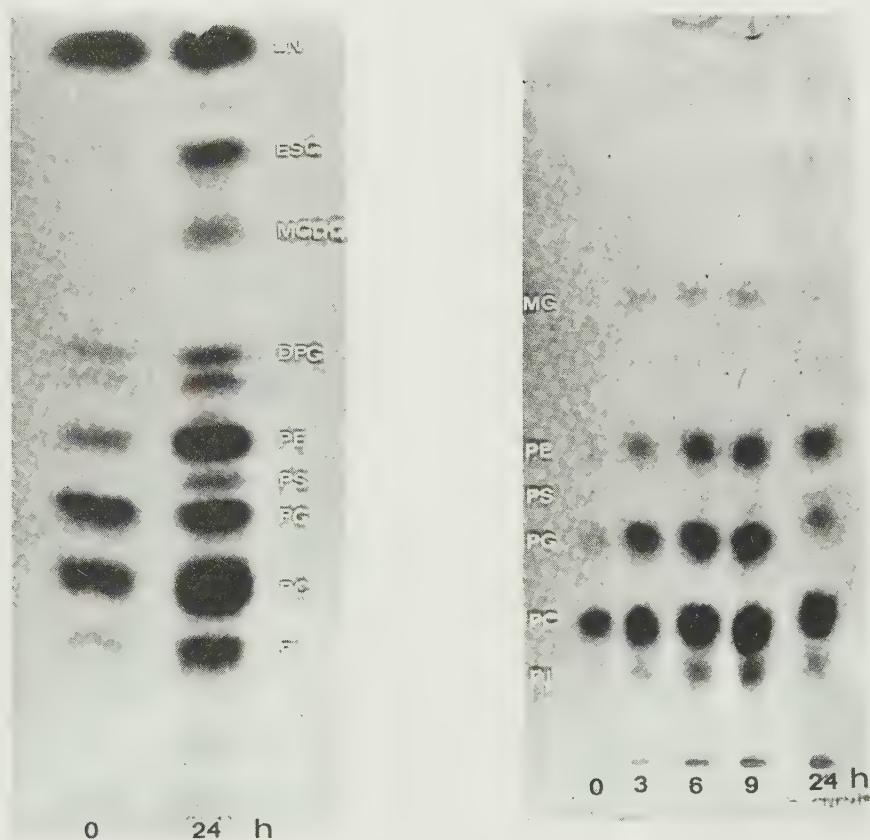


Fig. 28. Incorporation de l'acétate marqué in vivo dans les lipides des microsomes isolés de tranches de tissu maintenues en survie. Les temps de survie sont indiqués en heures. L'extrait lipidique total est analysé par chromatographie sur papier silicé. Les chromatogrammes sont autoradiographiés sur film Kodirex.

b) Fractions cellulaires.

b₁ - Incorporation du (1-¹⁴C)-acétate.
.....

On retrouve dans les fractions cellulaires, la stimulation préférentielle du marquage des phospholipides après survie ; dans les microsomes, le pourcentage de radioactivité totale retrouvé dans les phospholipides augmente de 42,5% à 58%.

Est-ce que l'augmentation du marquage intéresse tous les phospholipides ? L'examen du tableau XXII et de la figure 28 montre que les phospholipides les plus fortement marqués dans les microsomes ou les mitochondries de tissu frais sont la phosphatidylcholine (entre 38 et 43% de la radioactivité totale des phospholipides), la phosphatidyléthanolamine (entre 11,5 et 13,1%), le phosphatidylglycérol (26,8 à 33,8%), le phosphatidylinositol (de 9,3 à 13,0%). La stimulation des biosynthèses en cours de survie intéresse surtout la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine ; dans ce dernier phospholipide, le pourcentage de radioactivité (par rapport à la radioactivité totale des phospholipides) augmente de 13,1 à 26,8 (dans les mitochondries) et de 11,5 à 18,4 (dans les microsomes) (BEN ABDELKADER, 1969 ; BEN ABDELKADER et al., 1969).

Nous pouvons donc affirmer que ce sont les phospholipides azotés essentiels des membranes dont la synthèse augmente relativement le plus.

Les autres catégories moléculaires sont moins marquées ; ainsi le digalactosyldiglycéride n'est jamais marqué en une heure d'incubation, le monogalactosyldiglycéride ne contient qu'un pourcentage très faible de la radioactivité totale des lipides.

b₂ - Incorporation des autres précurseurs.
.....

Pour confirmer les résultats obtenus avec 1'(1-¹⁴C)-acétate, nous avons suivi l'incorporation d'autres précurseurs dans les différents phospholipides. Nous avons comparé les pourcentages de radioactivité mesurés dans les phospholipides des microsomes isolés de tranches en survie préalablement mises en incubation pendant une heure en présence de (³²P)-phosphate de sodium, (1-¹⁴C)-glycérol ou (Me-¹⁴C)-choline.

TABLEAU XXIII

Incorporation de divers précurseurs, in vivo, pendant une heure dans les microsomes isolés de tissu en survie (24 heures).

	% masse	% de radioactivité des phospholipides totaux			
		(1- ¹⁴ C)- acétate	(¹⁴ C)- glycérol	(³² P)- phosphate	(Me- ¹⁴ C)- choline
PC	57,5	38,4	43,0	40,0	93
PE	23,0	18,4	17,0	31,6	4,2
PG	1	26,4	18,3	6,2	—
PI	12	11,5	15,0	16,0	—
PS	2	0,9	2,7	1,9	—
DPG	1	1,5	2,3	1,6	—
PA	2	2,7	0,4	0,1	—

Le tableau XXIII montre clairement que, quel que soit le pré-seur utilisé, la phosphatidylcholine est le phospholipide le plus radio-actif, ceci étant particulièrement net dans le cas de la (Me-¹⁴C)-choline qui est pratiquement incorporée en totalité dans ce phospholipide, ce qui est logique. La phosphatidyléthanolamine est le phospholipide le plus radioactif après la phosphatidylcholine ; une observation intéressante est le marquage plus important de la phosphatidyléthanolamine quand le (³²P)-phosphate est le précurseur. Les autres phospholipides sont très peu radioactifs.

L'utilisation des 4 précurseurs différents indique que toutes les parties des molécules phospholipidiques sont synthétisées en cours de survie ; la comparaison entre le marquage de la phosphatidyléthanolamine par le (³²P)-phosphate de sodium ou le (1-¹⁴C)-acétate suggère toutefois une vitesse de synthèse différente de la tête polaire et des restes acylés de la molécule ; un tel résultat a déjà été précédemment signalé par BEN ABDELKADER et al. (1968) dans les mitochondries et les microsomes de parenchyme de Pomme.

3) Biosynthèse des acides gras.

En utilisant 1'(1-¹⁴C)-acétate comme précurseur, nous avons recherché si la stimulation des synthèses pendant la survie intéressait simultanément toutes les catégories d'acides gras.

a) Intensité des biosynthèses.

a₁ - Tissu entier.

Lorsque l'on met en présence de 1'(1-¹⁴C)-acétate des tranches de tissu préalablement mises en survie pendant des temps différents, on observe que la capacité de biosynthèse des acides gras augmente progressivement pendant la survie, atteignant un maximum à la 9ème heure. Nous retrouvons donc au niveau des acides gras la stimulation des synthèses lipidiques notée précédemment. Ceci pouvait être attendu logiquement,

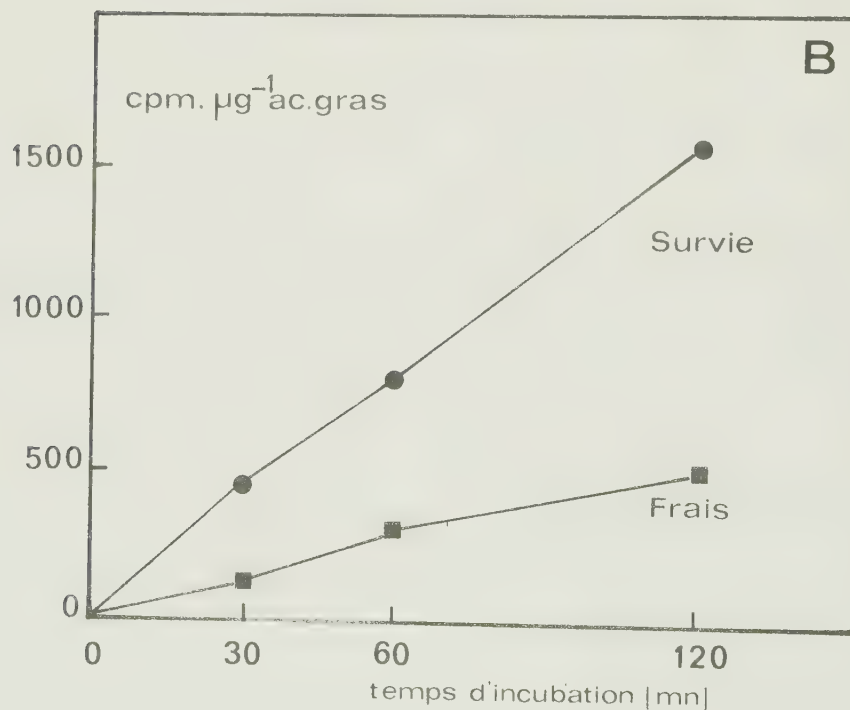
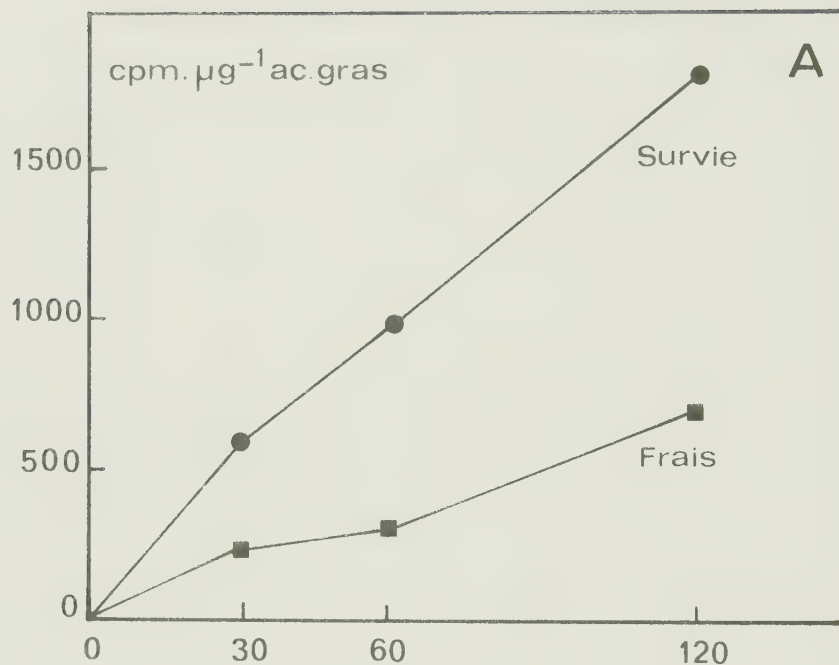


Fig. 29

Incorporation de l'acétate marqué in vivo dans les acides gras de microsomes (A) et de mitochondries (B) isolés de tranches fraîches ou en survie. Les radioactivités spécifiques des acides gras sont exprimées en cpm par microgramme d'acide.

étant donné que $1'(1-^{14}\text{C})$ -acétate, dans une molécule phospholipidique donnée,, s'incorpore essentiellement aux molécules d'acides gras.

a₂ - Fractions cellulaires.
.....

Les molécules d'acides gras radioactives se retrouvent dans les fractions microsomales et mitochondriales de plus en plus abondamment au cours de la survie. L'allure des courbes est identique à celle du tissu entier. Après 9 heures de survie, la stimulation atteint près de 500% (*Fig. 26c*).

Nous avons vérifié que ces résultats traduisaient bien une augmentation de la vitesse d'incorporation du précurseur radioactif dans les acides gras des fractions cellulaires, en suivant l'incorporation de $1'(1-^{14}\text{C})$ -acétate pendant deux heures dans des fractions de tranches fraîches ou de tranches préalablement maintenues en survie depuis 24 heures (*Fig. 29*). Pendant les deux heures d'incubation (le précurseur étant laissé constamment dans le milieu), la radioactivité spécifique exprimée par rapport au microgramme d'acide gras augmente régulièrement.

b) Nature des acides gras synthétisés.

La radiochromatographie en phase gazeuse nous a permis de déterminer quels étaient les acides gras synthétisés au cours de la survie.

b₁ - Comparaison entre tranches fraîches et tranches en survie.
.....

En accord avec les premières observations de WILLEMOT et STUMPF (1967a), nous avons mis en évidence un changement important dans la nature des acides gras synthétisés par le tissu entier au cours de la survie. Les tranches de tissu fraîchement coupées, après 1 heure d'incubation en présence d' $1'(1-^{14}\text{C})$ -acétate, ne contiennent pas d'acide linoléique radioactif, alors que les tranches de tissu après survie en contiennent des proportions importantes (*Tableau XXIV*) (*Fig. 30*).

TABLEAU XXIV

Incorporation de l'(1-¹⁴C)-acétate dans les acides gras totaux des tissus ou des fractions cellulaires après survie.

% de radioactivité totale

Acides gras	Tissu frais survie		Microsomes frais survie		Mitochondries frais survie		1.500g frais survie		Surn. survie
C ₁₆	29,1	25	26,1	18,7	32	29,7	25	30,0	32
C ₁₈	9,0	12,5	8,1	14,0	10,5	4,6	10	11,3	9
C _{18:1}	59,5	35,3	63,0	33,8	57,0	35,6	62,4	29,4	37,5
C _{18:2}	-	<u>24</u>	-	<u>27,2</u>	-	<u>24,1</u>	-	<u>24,6</u>	17,2
C ₂₀	2,0		4,6			6,0		4,6	3,8

Cette capacité de biosynthèse de l'acide *linoléique* est un des phénomènes les plus caractéristiques de la survie ; nous avons observé un tel phénomène des dizaines de fois, de même que CHERIF (1972) et DEMANDRE (1971).

b₂ - Fractions cellulaires.

Les molécules d'acide *linoléique* s'insèrent dans les lipides des fractions cellulaires que nous avons étudiées ; la radioactivité de l'acide *linoléique* des microsomes isolés de tranches fraîches mises en incubation en présence d'(1-¹⁴C)-acétate est négligeable, alors qu'elle est importante dans les microsomes de tranches marquées après 24 heures de survie ; dans ces conditions, l'acide *linoléique* (Fig. 30) représente plus de 30% de la radioactivité totale des acides gras (Tableau XXIV). Le même phénomène s'observe au niveau des fractions mitochondriales, du surnageant cytoplasmique ainsi que dans le culot obtenu à 1500 g/10 mn. Nous pouvons noter que le pourcentage de radioactivité présent dans l'acide *oléique* diminue après survie de 24 heures, diminution parallèle à l'augmentation observée dans l'acide *linoléique* (la somme des pourcentages de radioactivité retrouvée dans les deux acides reste à peu près constante).

c) Facteurs influençant la biosynthèse de l'acide linoléique.

c₁ - Conditions de mise en survie.

Nous avons vérifié que la technique de maintien en survie (Erlenmeyers ou entonnoirs à plaque de verre fritté) n'a aucun effet majeur sur l'induction de la capacité de synthèse de l'acide *linoléique*, dans la mesure où les 2 exigences essentielles de la survie sont satisfaites : humidité élevée et aérobiose. CHERIF (1972) a montré qu'une température moyenne et l'aérobiose sont indispensables au développement de la biosynthèse de l'acide *linoléique* ; ce phénomène est supprimé quand la survie se déroule au froid ou en atmosphère d'azote.

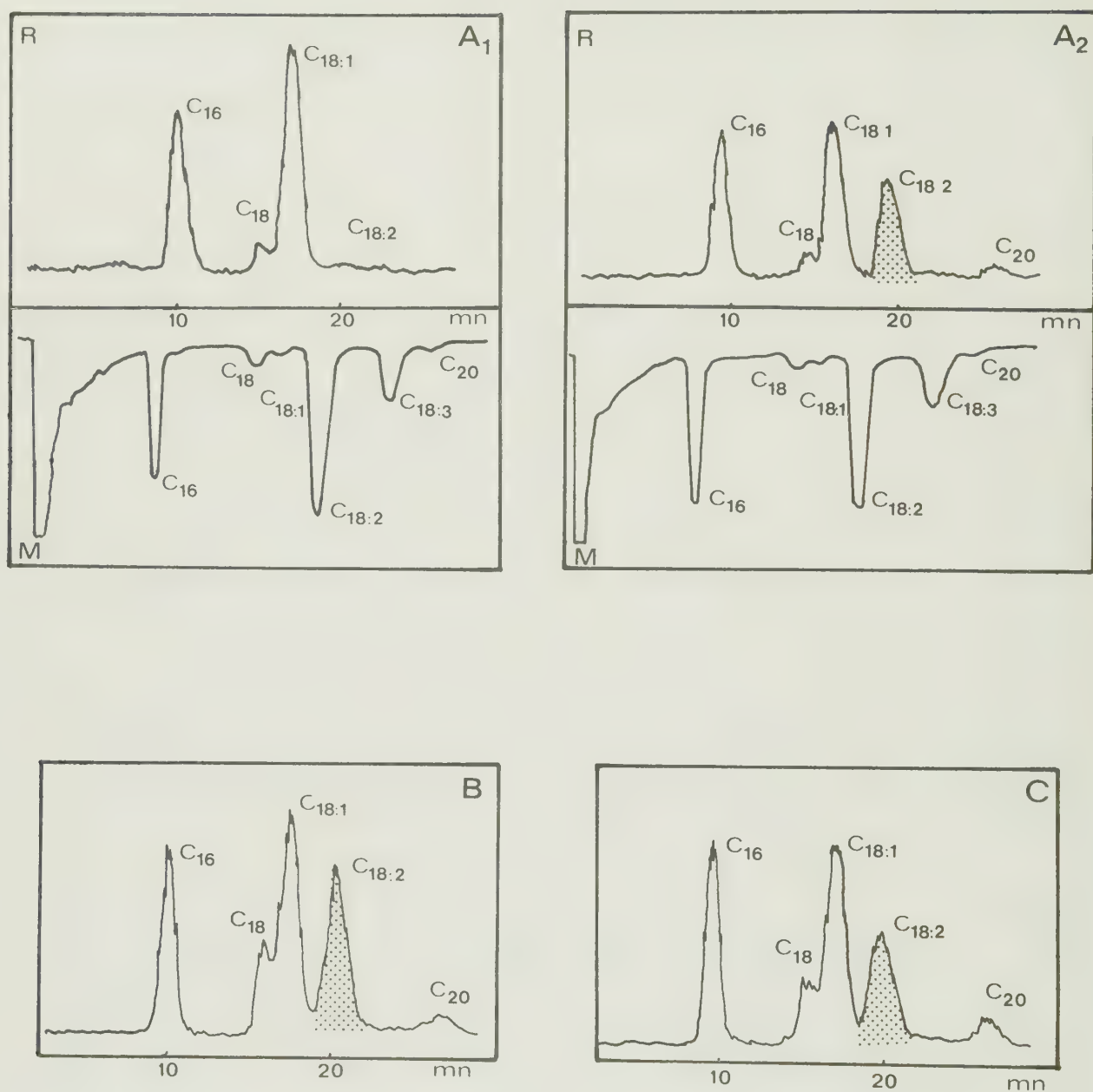


Fig. 30

Incorporation de l'acétate *in vivo* dans les acides gras de tranches de tissu frais (A₁) ou en survie (A₂) ou dans les acides gras des microsomes (B) ou des mitochondries (C) isolés de tranches en survie.

On a reproduit en A₁ et en A₂ les radiochromatogrammes complets montrant dans la partie inférieure la composition en masse (M) et dans la partie supérieure la distribution de la radioactivité (R). En B et C, seul ce dernier enregistrement est reproduit.

c₂ - Conditions de fourniture du précurseur radioactif.
.....

Les conditions de mise en incubation en présence du précurseur radioactif ont une grande importance ; en travaillant sur des tranches de tissu préalablement maintenues en survie pendant 24 heures dans des conditions identiques, les résultats de marquage peuvent être complètement différents si l'on varie la technique de fourniture du précurseur radioactif.

Nous avons effectué deux séries d'expériences à partir de 2 lots de 100 rondelles préalablement maintenues en survie. Le premier lot (A) est placé dans un unique Erlenmeyer de 250 ml contenant 20 ml de solution radioactive. Le deuxième lot (B) est divisé en 5 lots de 20 rondelles, placé chacun dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 4 ml de la même solution radioactive. Après une heure d'incubation, en agitation constante, on isole les microsomes des lots A et B, on en extrait les acides gras ; les radiochromatogrammes montrent un fait intéressant (Fig. 31) : si l'acide *linoléique* des microsomes du lot B est marqué d'une façon intense, la radioactivité de ce même acide est négligeable dans le lot A.

Ces résultats entraînent deux remarques. La première concerne la radioactivité incorporée dans l'acide *oléique* des tranches du lot A, qui est importante et analogue, en pourcentage de radioactivité totale, à celle trouvée dans le tissu frais ; ceci veut peut-être dire que le seuil de la concentration en oxygène nécessaire pour observer la synthèse de l'acide *oléique* est inférieur à celui nécessaire pour la synthèse de l'acide *linoléique*, puisque le premier acide gras serait probablement synthétisé grâce à l'oxygène présent dans les méats intercellulaires. La deuxième remarque a trait au grand intérêt que présentent ces tranches de tissu placées en "semi-anaérobiose" puisqu'elles contiennent tous les systèmes de synthèse de l'acide *linoléique* et que nous avons réussi à stopper les synthèses au niveau de l'acide *oléique*.

d) Cinétiques de formation pendant la survie.

d₁ - Variation des capacités de biosynthèse.
.....

En nous plaçant dans les conditions les plus favorables à la

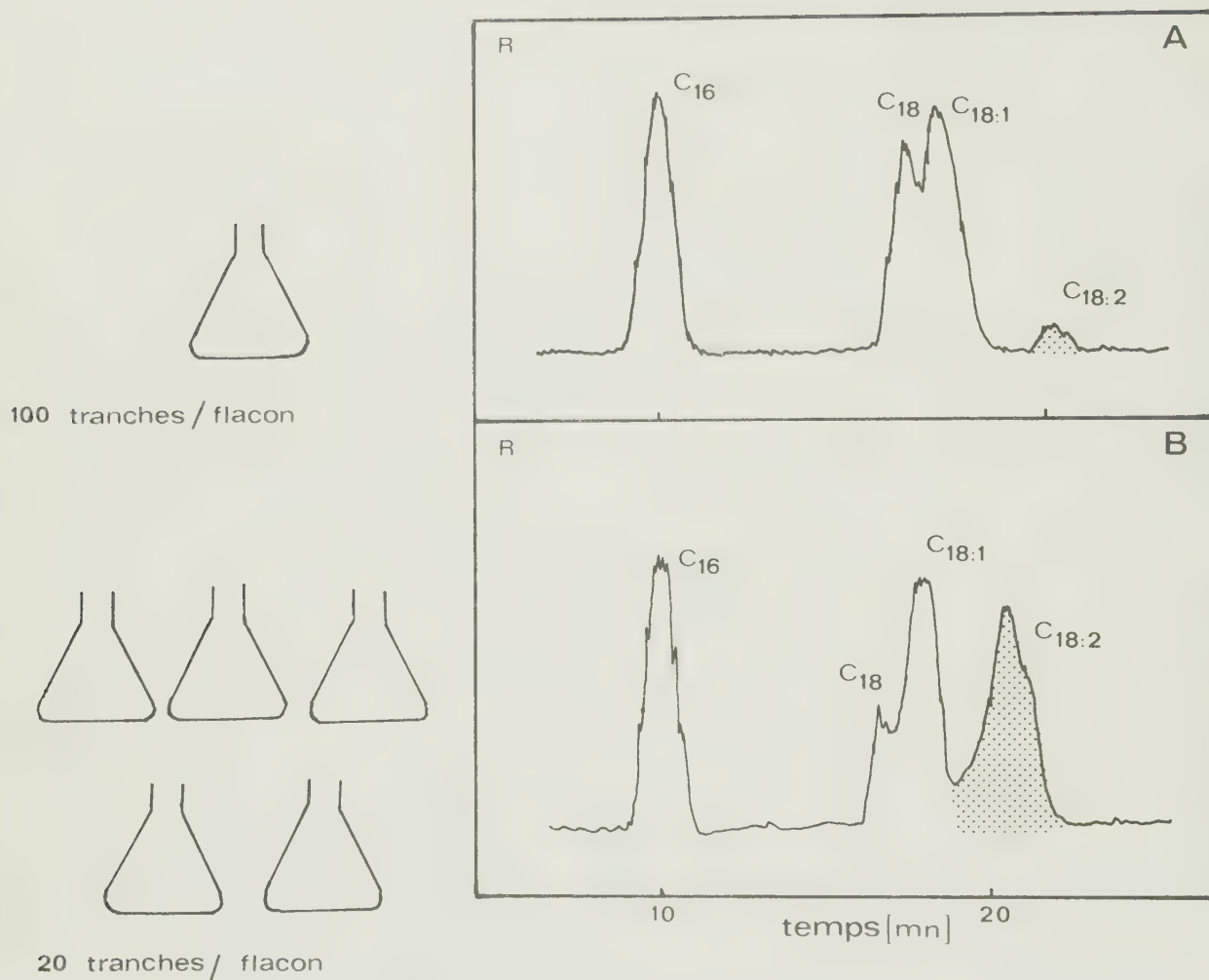


Fig. 31

Influence des conditions d'incubation in vivo sur la biosynthèse de l'acide linoléique.

Les tranches (au nombre de 100) ,maintenues préalablement en survie dans des conditions identiques, sont mises en incubation dans une seule fiole (A) ou sont réparties dans 5 fioles différentes, ce qui assure une meilleure aération (B). En A, le flacon contient 50 ml de milieu ; en B , les flacons contiennent 10 ml de milieu .

L'abréviation R indique que seules les portions de radiochromatogrammes en phase gazeuse donnant la distribution de la radioactivité parmi les acides gras ont été reproduites.

Le temps de l'enregistrement du radiochromatogramme est porté en abscisse.

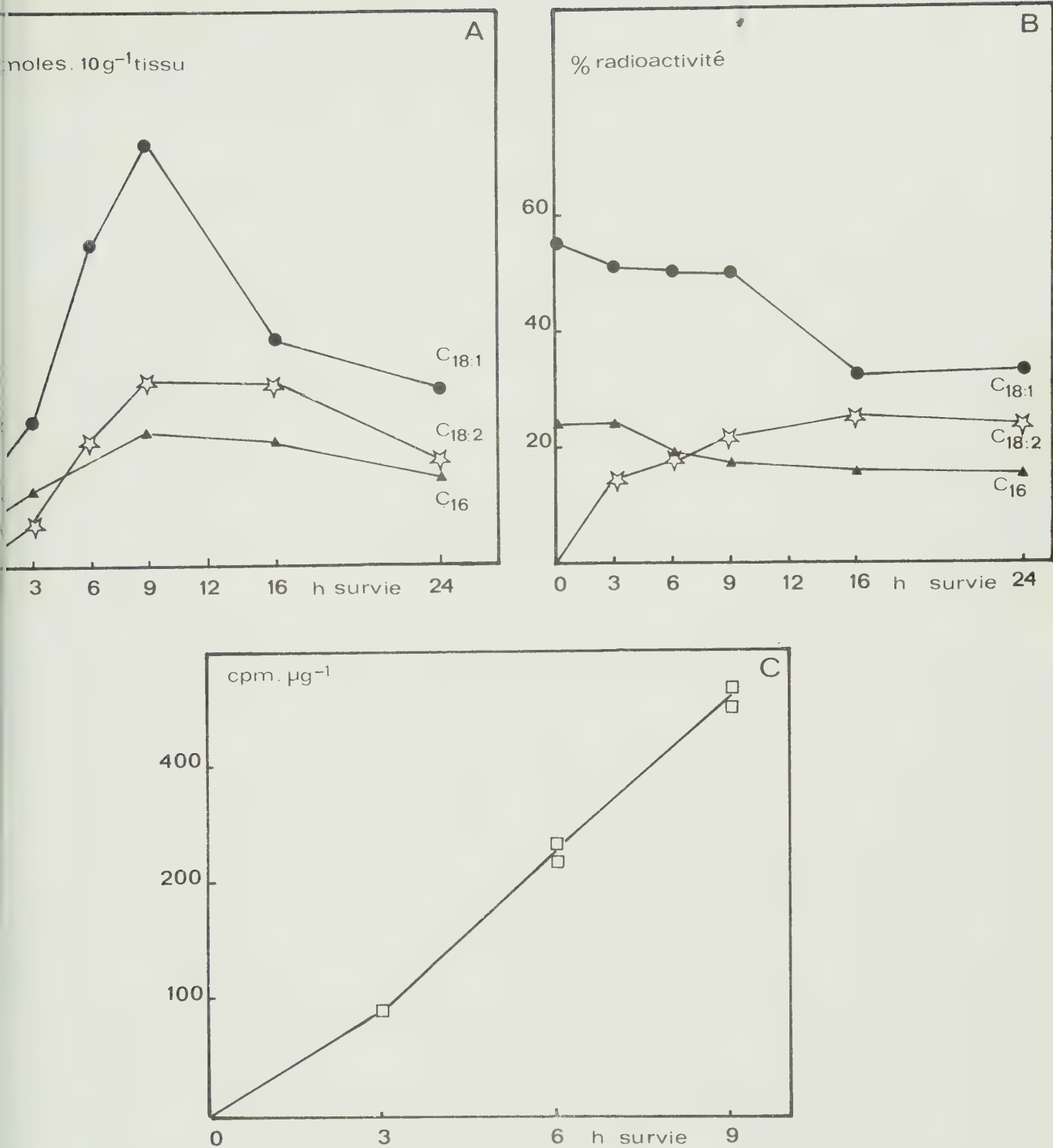


Fig. 32

Stimulation de l'incorporation de l'acétate marqué dans les acides gras des microsomes au cours de la survie.

En A : radioactivités totales exprimées en nanomoles incorporées par heure et pour un culot isolé de 10 g de tranches de tissu.

En B : pourcentages de radioactivité retrouvés dans les acides gras.

En C : radioactivités spécifiques de l'acide linoléique (en cpm par microgramme d'acide).

Les temps de survie sont indiqués en heures.

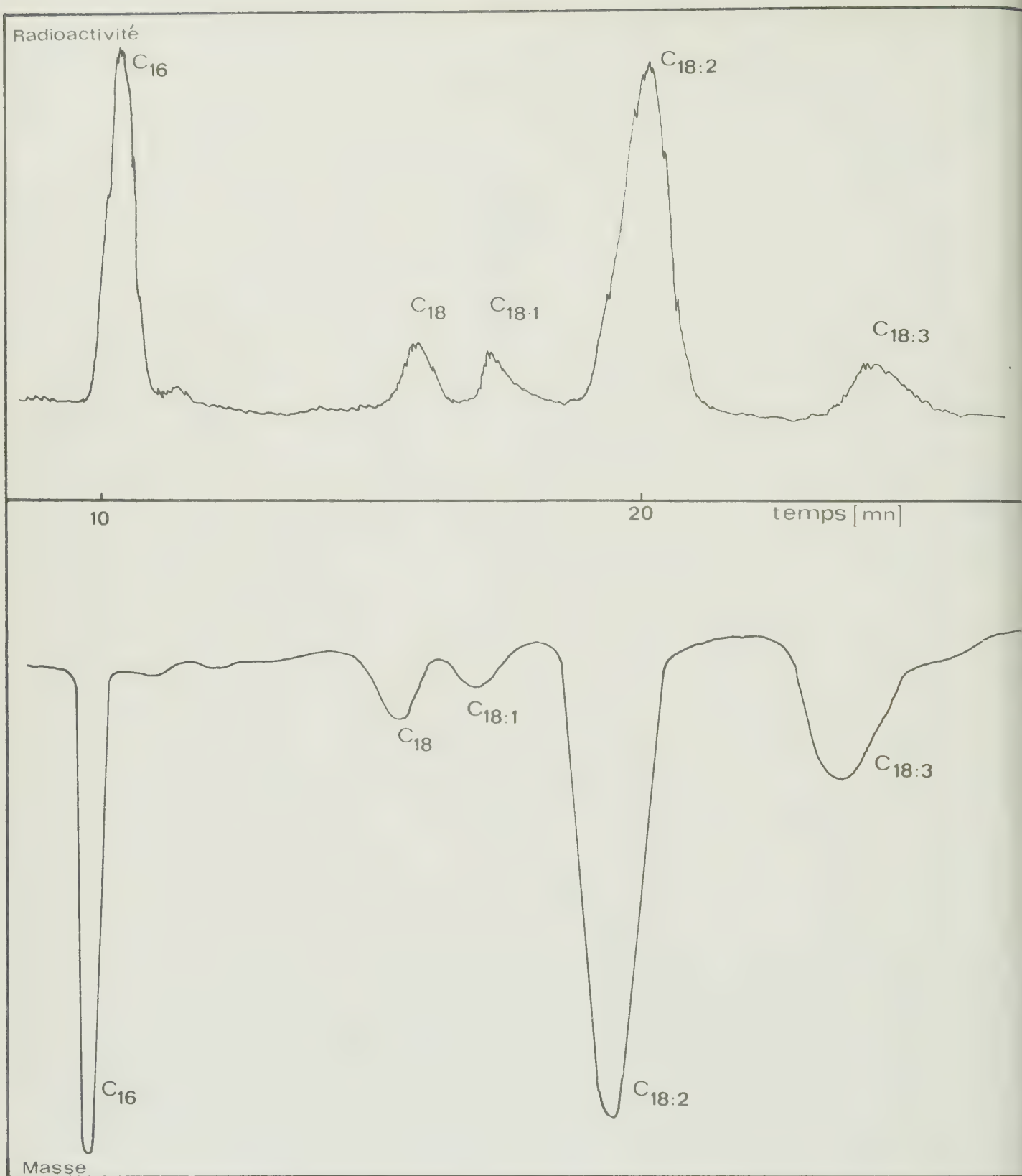


Fig. 33

Incorporation in vivo de l'acétate marqué dans les acides gras des microsomes de tranches de tubercule. Après une heure d'incubation de tranches fraîchement prélevées en présence du précurseur radioactif, ces tranches sont maintenues en survie pendant 23 heures dans un milieu non marqué.

Le chromatogramme du haut donne la distribution de la radioactivité parmi les acides gras. Le chromatogramme du bas indique la composition en masse.

synthèse de l'acide *linoléique*, nous avons cherché à savoir si la capacité de biosynthèse de cet acide se manifeste rapidement après le début de la survie.

Les graphiques montrent (*Fig. 32*) que ce phénomène apparaît progressivement au cours de la survie. En pourcentage de radioactivité totale, un maximum (25%) est observé dès 9 heures. On observe parallèlement une diminution du pourcentage de la radioactivité retrouvée dans l'acide *oléique*, ce qui suggère une désaturation de l'acide *oléique* en acide *linoléique* désaturation mise en évidence dans les tissus végétaux par plusieurs chercheurs (MAZLIAK, 1968).

En radioactivité totale, le maximum est aussi observé à la 9ème heure, puis une décroissance de la capacité de biosynthèse de cet acide, ainsi que celle de tous les autres acides gras d'ailleurs, se produit.

d₂ - Technique d'incubation brève de tranches fraîches, suivie de 24 heures
.....
de survie.
.....

Nous venons de signaler que le pourcentage de radioactivité présent dans l'acide *linoléique* atteint un maximum de 25%, alors qu'en masse cet acide gras représente plus de 50% de la masse totale, l'acide *oléique* (5 à 7% de la masse totale, des acides gras) contenant plus de 40% de radioactivité. Ceci s'explique bien si l'on admet l'hypothèse classique, impliquant une désaturation de l'acide *oléique* en acide *linoléique* ; la présence constante de l'acétate radioactif pendant l'incubation permet une synthèse continue de l'acide *oléique* qui se retrouverait toujours plus marqué que l'acide *linoléique*, dont la synthèse serait plus lente. Il est possible de modifier les proportions respectives du marquage des deux acides en réalisant une incubation d'une heure dans une solution d'($1-^{14}\text{C}$)-acétate avec des tranches fraîches, puis en maintenant ces tranches en survie normale, sur milieu non radioactif, pendant 23 heures. Si une synthèse d'acide *linoléique* se produit, elle s'effectuera en partie à partir de l'acide *oléique* marqué pendant la première heure. Dans ces conditions, on observe que tous les acides gras sont marqués proportionnellement à leur masse (*Fig. 33*), ils ont donc tous à peu près la même radioactivité spécifique. Ces résultats nous permettent d'affirmer que les biosynthèses de lipides qui se déroulent au cours de la survie n'échappent pas à la régulation normale de la lipogenèse de la cellule ; en outre, les nouvelles membranes qui apparaissent au cours

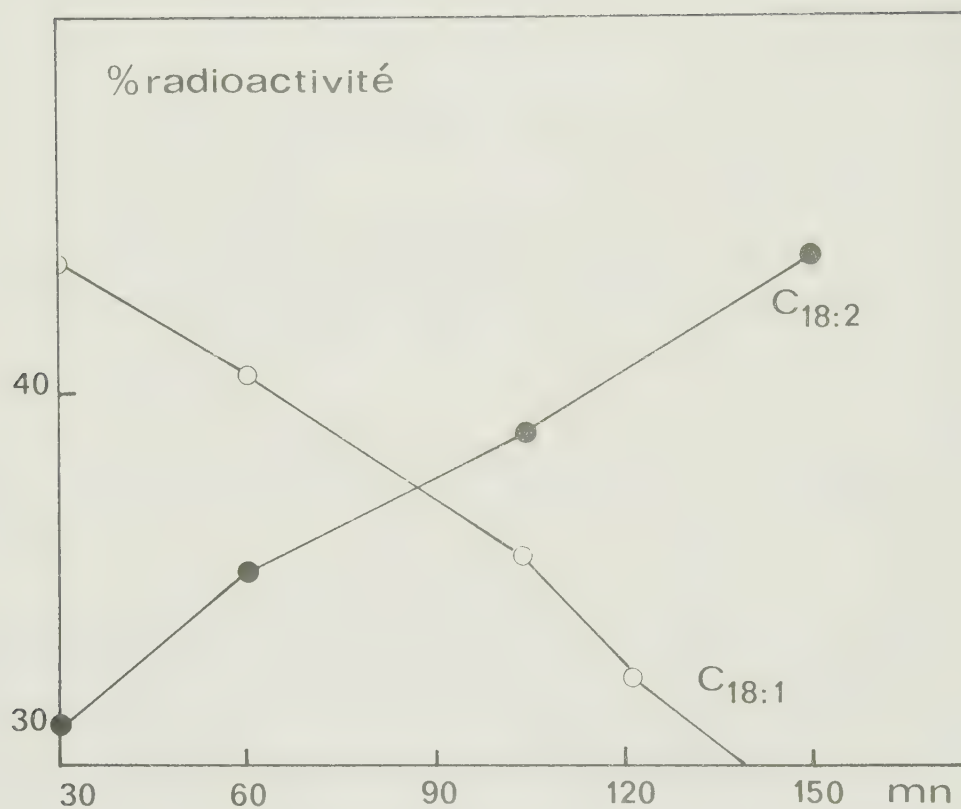


Fig. 34 Variations des pourcentages de radioactivité totale des acides gras, retrouvés dans l'acide oléique (C_{18:1}) et dans l'acide linoléique (C_{18:2}) des microsomes de tranches en survie, mises en incubation dans une solution contenant de l'(1-¹⁴C)-acétate pendant 30 mn, puis transférées dans un milieu non radioactif jusqu'à 150 mn.

de la survie contiennent des proportions normales d'acide *linoléique* nouvellement synthétisé.

d₃ - Incubation brève de tranches en survie en présence de l'(1-¹⁴C)-acétate
.....
suivie d'un maintien en milieu non radioactif.
.....

Afin de suivre plus précisément cette désaturation d'acide *oléique* en acide *linoléique*, nous avons mis des tranches, préalablement maintenues en survie, en incubation pendant 30 mn dans une solution de précurseur radioactifs. Puis nous rinçons abondamment les tranches de tissu et nous les maintenons en milieu non radioactif pendant deux heures.

On observe que dans les acides gras des microsomes, l'acide *oléique*, qui est l'acide le plus radioactif au début de l'expérience, contient un pourcentage de plus en plus faible de la radioactivité totale des acides gras (Fig. 34). L'augmentation du pourcentage de radioactivité de l'acide *linoléique* (la somme des radioactivités totales de tous les acides gras restant à peu près constante pendant l'expérience) confirme bien l'hypothèse d'une désaturation de l'acide *oléique* en acide *linoléique*.

d₄ - Incubation préliminaire en semi-anaérobiose suivie d'incubation en
.....
aérobiose.
.....

Nous avons déjà vu que des incubations en semi-anaérobiose (un grand nombre de rondelles étant placées dans un petit volume) permettaient de marquer l'acide *oléique* de microsomes isolés de tranches en survie, sans que l'acide *linoléique* devienne radioactif. En prenant ces tranches de tissu et en les remettant en aérobiose (dans un milieu sans précurseur radioactif), on peut savoir si l'acide *oléique* endogène peut être désaturé en acide *linoléique*.

Dans les tranches en survie incubées en semi-anaérobiose, les acides gras radioactifs sont l'acide *palmitique*, l'acide *stéarique* (plus fortement marqué qu'en conditions normales) et l'acide *oléique* (Fig. 35). L'acide *linoléique* n'est pas radioactif. Après deux heures de maintien en milieu aérobie les acides saturés restent fortement marqués. Le pourcentage

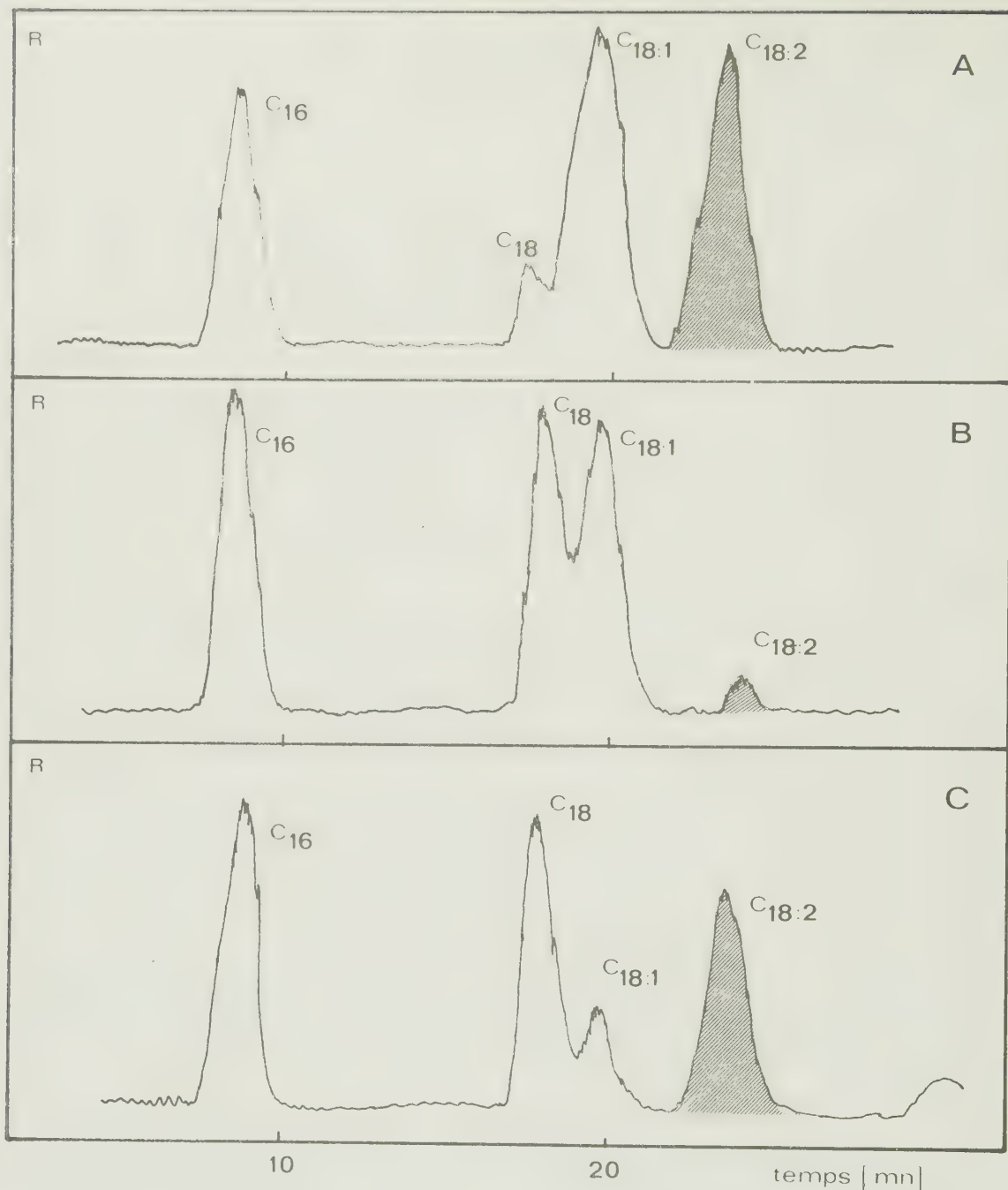


Fig. 35

Influence des conditions d'incubation sur l'incorporation de l'acétate marqué in vivo dans les microsomes de tissu en survie.

A - une heure d'incubation en aérobiose

B - une heure d'incubation en semi-anaérobiose (cf. Fig.31)

C - une heure d'incubation en semi-anaérobiose + une heure de "chasse" en aérobiose normale

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

de radioactivité de l'acide *oléique* a fortement baissé, alors que l'acide *linoléique* devient radioactif.

La désaturation de l'acide *oléique* endogène semble donc donner naissance à l'acide *linoléique*.

d₅ - Désaturation de l' (1-¹⁴C)-oléate d'ammonium.
.....

Une démonstration directe de la validité de l'hypothèse suggérant une désaturation de l'acide *oléique* est apportée par l'expérience suivante : on met des rondelles en survie (10 g de matière fraîche) en présence de 5 nanomoles d' (1-¹⁴C)-oléate d'ammonium dissoutes dans 1 ml d'une solution de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. Après une heure d'agitation à 25°C, les tranches de tissu sont abondamment rincées et les microsomes en sont isolés ; l'analyse des acides gras par radiochromatographie en phase gazeuse (Fig. 36) révèle que 1) l'acide *oléique* microsomal est radioactif, ce qui indique une insertion du précurseur dans les membranes microsomales. 2) l'acide *linoléique* est marqué, ce qui confirme que le précurseur a été désaturé (36% de l'acide *oléique* est désaturé). La désaturation de l'acide *oléique* est ainsi démontrée. Il est intéressant de signaler que l'expérience conduite sur les tranches fraîches ne permet de noter aucune désaturation ; seule une insertion de l'acide *oléique* est observée.

4) Distribution dans les diverses catégories moléculaires.

En combinant des techniques de chromatographie sur couche mince et de radiochromatographie en phase gazeuse, nous avons recherché dans quelles catégories moléculaires lipidiques s'insèrent spécifiquement les molécules d'acides gras polyinsaturés synthétisées pendant la survie.

En nous plaçant dans les conditions décrites dans le paragraphe d₂, c'est à dire 1 heure d'incubation de tranches fraîches, suivie de 23 heures de survie, nous obtenons des tranches de tissu contenant de l'acide *linoléique* faiblement radioactif. Ceci nous permet de suivre l'insertion de tous les acides gras polyinsaturés dans les catégories lipidiques.

La technique consiste à chromatographier les lipides bruts extraits

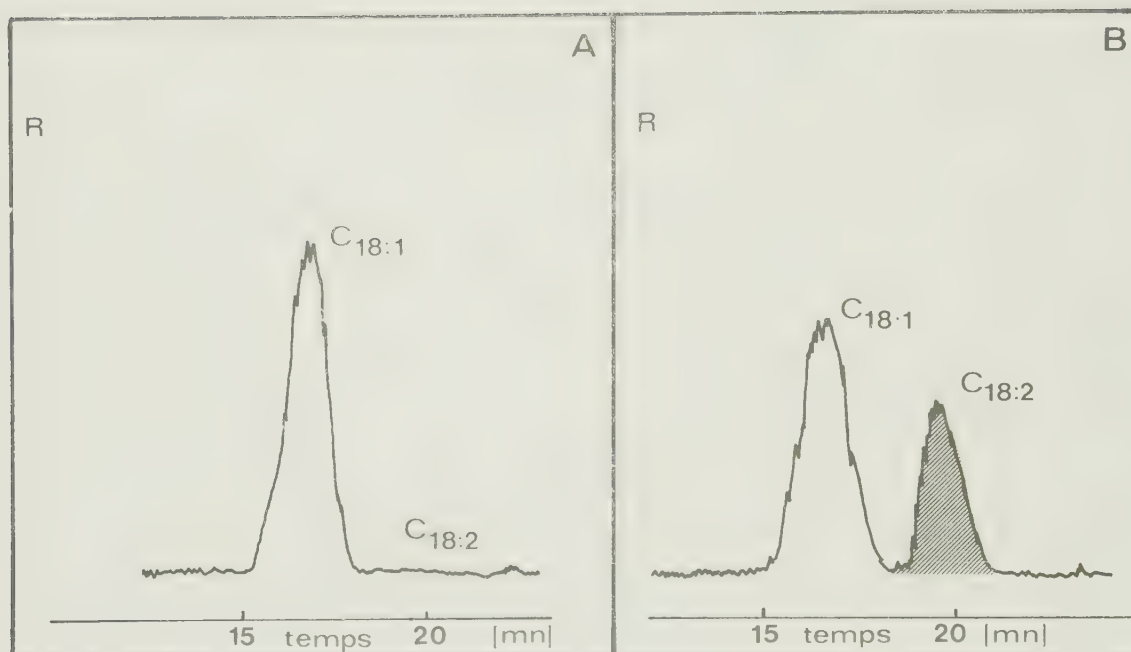


Fig. 36

Radiochromatogrammes en phase gazeuse montrant la désaturation in vivo de l'oléate d'ammonium marqué par les microsomes isolés de tranches en survie (B); les microsomes isolés de tranches fraîches sont incapables d'une telle désaturation (A).

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

TABLEAU XXV

Biosynthèse des acides gras in vivo dans les microsomes isolés de tranches en survie, préalablement mises en incubation, une heure durant, en présence de (1-¹⁴C)-acétate, avant le maintien en survie.

On a indiqué ici les pourcentages de radioactivité retrouvés dans les acides gras des différentes classes lipidiques.

	% de radioactivité					
	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C ₂₀
Lipides totaux	24,0	3,2	20,5	<u>38,5</u>	<u>4,9</u>	4,6
Phospholipides	24,0	3,0	23,0	<u>49,0</u>	0	1,0
D G D G	29,7	10,5	30,8	13,9	4,3	7,1
M G D G	19,5	4,7	40,8	14,8	<u>20,2</u>	—
Lipides neutres	39,0	21,4	20,3	13,5	5,4	—

TABLEAU XXVI

Biosynthèse des lipides in vivo dans les microsomes isolés de tranches en survie préalablement mises en incubation dans une solution d'(1-¹⁴C)-acétate. On a indiqué ici la distribution de la radioactivité dans les acides gras des différents phospholipides.

Les abréviations utilisées sont expliquées dans le texte.

% de la radioactivité totale					
	PC	PE	PI	PG	LN
C ₁₆	18,0	21,0	38,2	42	27,7
C ₁₈	17	13,7	14,8	10,5	15,0
C _{18:1}	37	20,0	16,7	18,1	29,8
C _{18:2}	25,8	25,0	6,0	20,4	20,4
C ₂₀	1,0	15,0	16,3	1,0	3,4

du tissu entier préalablement traité comme indiqué ci-dessus. Les spots correspondant aux phospholipides, au monogalactosyldiglycéride, au digalactosyldiglycéride et aux lipides neutres sont grattés des plaques et les acides gras des différents lipides sont analysés par radiochromatographie en phase gazeuse. Les radiochromatogrammes montrent que l'acide *linoléique* est préférentiellement associé aux phospholipides ; plus de 49% de la radioactivité totale des acides gras des phospholipides est contenue dans leur acide *linoléique* (Tableau XXV). Par contre l'acide *linoléique* des phospholipides n'est pas du tout radioactif. Cet acide gras est spécifiquement associé aux galactolipides (digalactosyldiglycéride et surtout monogalactosyldiglycéride) où le pourcentage de radioactivité totale présent dans l'acide *linoléique* peut atteindre jusqu'à 20%. Les lipides neutres sont beaucoup plus riches en acides saturés.

L'insertion spécifique de l'acide *linoléique* dans les galactolipides a été trouvée dans les tissus de jeunes feuilles de Pois (TREMOLIERES, 1972). Le monogalactosyldiglycéride, le constituant lipidique le plus insaturé, contient la plus forte proportion d'acide *linoléique*.

Dans quel type de phospholipide s'insèrent préférentiellement les molécules d'acide *linoléique* nouvellement synthétisées ? Nous avons étudié ce problème au niveau des microsomes isolés de tranches en survie mises en présence d'acétate radioactif pendant une heure. Nous savons que, dans ces conditions, l'acide *linoléique* des microsomes est activement synthétisé. On sépare par chromatographie sur couche mince la solution lipidique totale préalablement extraite de ces microsomes. Il est clair que l'acide *linoléique* de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine contient une partie importante de la radioactivité totale des acides gras (respectivement 25,0 et 25,8%) (Tableau XXVI) ; par contre le phosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol contiennent surtout des acides gras saturés radioactifs : acides *palmitique* et *stéarique* (ainsi que l'acide *oléique*). On constate donc que les nouveaux acides formés s'insèrent bien, dans les différents phospholipides, conformément à la composition typique des phospholipides membranaires ; les phospholipides basiques reçoivent la majorité des acides gras polyinsaturés nouvellement synthétisés. Les phospholipides acides reçoivent surtout les acides gras saturés néoformés.

Une partie très importante des molécules d'acides gras nouvellement synthétisés s'insère préférentiellement dans la phosphatidylcholine. Des quantités plus faibles d'acides gras radioactifs sont retrouvés dans

les autres phospholipides. Dans les lipides neutres, on trouve ainsi une assez forte quantité d'acides gras radioactifs.

CONCLUSIONS DE L'ETUDE IN VIVO.

Les expériences concernant la biosynthèse des lipides in vivo nous permettent d'affirmer que les augmentations en masse des phospholipides, dans les fractions cellulaires isolées, sont bien dues à une biosynthèse intense de ces constituants pendant la survie. Les stimulations importantes - et préférentielles - de la biosynthèse des phospholipides se traduisent par une accumulation de phospholipides néoformés dans toutes les fractions cellulaires et notamment dans les microsomes. Les phospholipides les plus fortement radioactifs sont la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, c'est-à-dire les phospholipides azotés les plus importants pondéralement dans les microsomes ou les mitochondries. Les données métaboliques et analytiques se rejoignent donc parfaitement.

L'affirmation qu'il s'agit d'une biosynthèse totale des molécules phospholipidiques complètes est basée sur les résultats d'expériences où la biosynthèse de toutes les parties des molécules phospholipidiques (essentiellement de la phosphatidylcholine) a été suivie grâce aux 4 précurseurs différents: (1-¹⁴C)-acétate, (1-¹⁴C)-glycérol, (³²P)-phosphate de sodium, (Me¹⁴C)-choline.

Peut-on parler seulement de biosynthèse, lorsqu'on observe une grande augmentation de la radioactivité des phospholipides des fractions cellulaires au cours de la survie ? En toute rigueur, nous suivons dans ces expériences de marquage plutôt la résultante des phénomènes de biosynthèse et de dégradation, c'est-à-dire qu'en fait - si les phénomènes de dégradation sont importants - nous sous-estimerons nos intensités de biosynthèse. Mais ceci n'est vrai que si les phospholipides, dès qu'ils sont synthétisés, sont soumis à une intense dégradation ; si la dégradation des lipides est plus forte dans les tranches fraîches, et plus faible dans les tranches en survie, nous risquons donc d'obtenir des radioactivités plus élevées dans les tranches en survie non pas parce que les synthèses sont plus intenses, mais bien parce que les dégradations sont plus faibles. Toutes ces considérations peuvent être écartées si l'on considère les arguments suivants :

- la stimulation de la radioactivité des lipides est multipliée par 5 ou plus après la 9ème heure de survie. Il faudrait donc imaginer, si l'intensité des biosynthèses n'avait pas varié, que la dégradation des lipides dans les tranches fraîches détruisait les 4/5 des acides gras synthétisés, ce qui est de prime abord invraisemblable.
- des expériences montrent qu'une telle dégradation intense n'est pas envisageable : les constituants lipidiques membranaires sont d'une remarquable stabilité (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1971) et la survie ne modifie en rien cette stabilité. Si des tranches en survie sont mises en présence du précurseur radioactif pendant une demi-heure, puis sont transférées dans un milieu non radioactif pendant deux heures, la radioactivité totale des phospholipides des fractions cellulaires reste remarquablement constante (seule une légère baisse indique cependant qu'un renouvellement lent se manifeste).

Pour toutes ces raisons - et l'utilisation des inhibiteurs de la synthèse protéique nous en apportera d'autres - nous pouvons parler d'une *véritable capacité accrue de biosynthèse* des lipides membranaires en cours de survie.

Nous avons retrouvé au niveau de toutes les fractions cellulaires étudiées une incorporation intense de l'(1-¹⁴C)-acétate dans l'acide *linoléique* au cours de la survie ; cet acide gras n'est pas radioactif dans les tranches fraîches ; l'étude de ce phénomène est d'un grand intérêt puisque les caractéristiques de la biosynthèse de cet acide sont loin d'être connues. Nous avons tout d'abord recherché les meilleures conditions expérimentales pour suivre la biosynthèse de cet acide gras ; des conditions d'aérobiose sont indispensables pour le *développement* des systèmes enzymatiques (pendant le maintien en survie) et pour la *révélation* de l'activité de ces systèmes enzymatiques (pendant la mise en incubation des tissus en présence d'acétate radioactif).

Nous avons ensuite suivi le cheminement des molécules d'acide *linoléique* nouvellement synthétisées, d'une part au niveau intracellulaire et, d'autre part, au niveau des classes lipidiques et des phospholipides de ces fractions.

- au niveau intracellulaire -, l'insertion préférentielle s'effectue dans les membranes microsomales qui contiennent constamment la majeure partie des acides gras synthétisés. Les mitochondries contiennent une fraction plus faible des molécules d'acide *linoléique*. Ces différences s'expliquent

en partie (mais en partie seulement) par la plus grande importance du pool d'acides gras associé aux microsomes et aux mitochondries. Même en radioactivité spécifique, les acides gras des microsomes sont plus fortement marqués ; il est important de signaler que la distribution de la radioactivité dans les différents acides gras est à peu près la même dans toutes les fractions cellulaires.

La stimulation des biosynthèses d'acides gras atteint - comme celles des phospholipides - un maximum à la 9ème heure de survie ; c'est à ce moment que la synthèse de l'acide *linoléique* est la plus importante ; dans cet acide se retrouve 25% de la radioactivité totale des acides gras (lorsque les tranches sont mises 1 heure en présence d'acétate radioactif) ; cette proportion ne changera plus par la suite.

- au niveau des catégories lipidiques , il est bien net que les molécules d'acide *linoléique* viennent se fixer préférentiellement aux molécules de phospholipides et, plus particulièrement, à la phosphatidylcholine et à la phosphatidyléthanolamine. La phosphatidylcholine contient toujours la plus forte proportion d'acides gras nouvellement synthétisés ; avant survie, elle contient surtout l'acide *oléique* marqué ; dans les tranches en survie, elle contient surtout de l'acide *linoléique* marqué . Ce lien préférentiel entre les molécules de phosphatidylcholine et d'acide *linoléique* peut être expliqué :

- a) par une fixation préférentielle des molécules d'acide *linoléique* (synthétisées ailleurs) ; on peut citer en faveur de cette hypothèse de récentes observations de DEVOR et MUDD (1971b) qui ont montré qu'une transacylase isolée de microsomes d'Epinard pouvait catalyser l'acylation de lysophosphatidylcholine

- b) par la désaturation de l'acide *oléique* en acide *linoléique* liée à la phosphatidylcholine. Cette hypothèse, émise par NICHOLS et al. (1967), GURR et al. (1968), GURR et al. (1969), attribue à ce phospholipide un rôle de cofacteur nécessaire à la désaturation. Il est difficile de trancher en faveur de l'une ou l'autre hypothèse.

On peut se demander quel est le site cellulaire de la biosynthèse de cet acide *linoléique* qui s'insère dans les membranes. Pour répondre à cette question il faut effectuer des expériences *in vitro*. Or nous savons qu'il faut généralement attendre plusieurs heures pour que l'acide *linoléique* soit marqué dans d'autres tissus végétaux (STUMPF, 1970) : parenchyme de Pomme (MAZLIAK, 1965), hachis de feuille de Ricin (JAMES, 1962), mésocarpe

d'Avocat (MUDD et STUMPF, 1961). Il est très difficile de conserver *in vitro* pendant plusieurs heures une fraction cellulaire active. Mais dans le tissu en survie, dès 30 à 60 mn d'incubation, le marquage de l'acide *linoléique* est intense. En raison de ces synthèses rapides, le tissu en survie est donc un bon matériel pour étudier *in vitro* la biogénèse de ces acides gras majeurs dans les membranes cellulaires.

B - ETUDE IN VITRO.

Les études *in vivo* nous ont montré que tous les lipides synthétisés dans les tissus en cours de survie se retrouvent dans les diverses fractions cellulaires isolées après survie. Est-ce-à-dire que toutes ces fractions cellulaires - microsomes, mitochondries - contiennent les enzymes nécessaires à la synthèse des acides gras et des phospholipides ? Pour répondre à cette question et déterminer la localisation intracellulaire des synthèses lipidiques, il est nécessaire de faire des expériences *in vitro* consistant à isoler les fractions cellulaires de tissu (non radioactif), puis à les mettre en incubation dans des solutions contenant divers précurseurs radioactifs.

Nos travaux ont porté essentiellement sur l'examen des capacités de biosynthèse des lipides des mitochondries et des microsomes.

1) Biosynthèse des lipides dans les mitochondries isolées.

Nous comparerons les capacités de biosynthèse des mitochondries isolées de tranches fraîches à celles provenant des mitochondries de tranches maintenues en survie. Nous examinerons successivement les incorporations globales des précurseurs, l'influence de la quantité de protéines, l'influence de divers cofacteurs, la nature des lipides synthétisés.

a) Biosynthèse des acides gras.

a₁ - Choix du précurseur.
.....

TABLEAU XXVII

Biosynthèse des lipides par les mitochondries isolées.

Les conditions d'incubation sont les suivantes : la suspension mitochondriale (0,5 ml) est placée dans une fiole de Warburg contenant les produits suivants : succinate de sodium (2,5 mM), ATP (1 mM), NADPH (1 mM), CoASH (1 mM), tampon Tris-HCl (50 mM), le pH final est 7,5 ; le volume final du mélange expérimental est de 4 ml. La fiole est constamment agitée et maintenue à 25°C pendant l'expérience. 182 nanomoles de précurseur radioactif (1-¹⁴C)-acétate ou (1-¹⁴C)-acétyl-coenzyme A sont introduites dans la fiole d'expérience.

A/ Influence de la nature du précurseur radioactif sur les intensités de biosynthèse.

Précurseur	nanomoles incorporées.heure ⁻¹ . mg protéines ⁻¹	
	FRAIS	SURVIE
(1- ¹⁴ C)-acétate	2,6	3,1
(1- ¹⁴ C)-acétyl-coenzyme A	2,7	2,9

B/ Influence de la composition du milieu d'incubation sur les intensités de biosynthèse des acides gras.

Le précurseur radioactif est le (1-¹⁴C)-acétate.

	nanomoles incorporées.heure ⁻¹ . mg protéines ⁻¹
Milieu complet	3,12
- Succinate	1,20
- ATP	1,40
- NADPH	2,9
- CoASH	3,02
- Oxygène	0,2

Nous avons pu obtenir, avec les mitochondries isolées, des biosynthèses d'acides gras à partir des deux précurseurs suivants : le $(1-^{14}\text{C})$ -acétate de sodium et le $(1-^{14}\text{C})$ -acétyl-coenzyme A.

En une heure, les mitochondries isolées de tranches fraîches incorporent une quantité très voisine de chacun de ces deux précurseurs (*Tableau XXVII*). Cette observation indique que les mitochondries isolées contiennent l'acétate thiokinase réalisant l'activation indispensable de l'acétate en acétyl-coenzyme A pour la biosynthèse des acides gras. La vitesse de cette réaction n'est nullement limitante pour l'incorporation de l'acétate dans les lipides mitochondriaux ; cette observation rejoint celles de YANG et STUMPF (1965) et de MAZLIAK et al. (1972).

Les quantités de précurseur incorporées par mg de protéines se comparent assez bien avec les valeurs obtenues par d'autres auteurs sur les mitochondries végétales : 3,7 nanomoles d'acétate sont incorporées dans les acides gras de mitochondries de Chou-fleur (MAZLIAK et al., 1972), 1,87 dans les acides gras des mitochondries d'Avocat (MUDD et STUMPF, 1961), 0,012 nanomoles d'acétate dans les mitochondries de germination de Pois (MACEY et STUMPF, 1968), 0,26 nanomoles dans les mitochondries de Féverole (MAZLIAK et al., 1972).

Dans les mitochondries isolées de tissu en survie, les quantités de précurseur incorporées ne sont pas plus importantes que dans les mitochondries isolées de tissu frais. Nous reviendrons sur cette constatation par la suite.

Etant donné que l'acétate est aussi intensément incorporé dans les mitochondries que l'acétyl-CoA, nous avons utilisé exclusivement le premier dans la suite de ce travail.

a₂ - Cinétique d'incorporation de l' $(1-^{14}\text{C})$ -acétate.

L'incorporation de l' $(1-^{14}\text{C})$ -acétate dans les mitochondries isolées de tranches fraîches ou en survie se poursuit linéairement en fonction du temps pendant 120 mn (*Fig. 37*). L'incorporation est aussi intense (par mg de protéines) dans les mitochondries isolées de tissu frais que dans les mitochondries isolées de tissu en survie.

Il est intéressant de noter que, pendant cette incubation à 25°C,

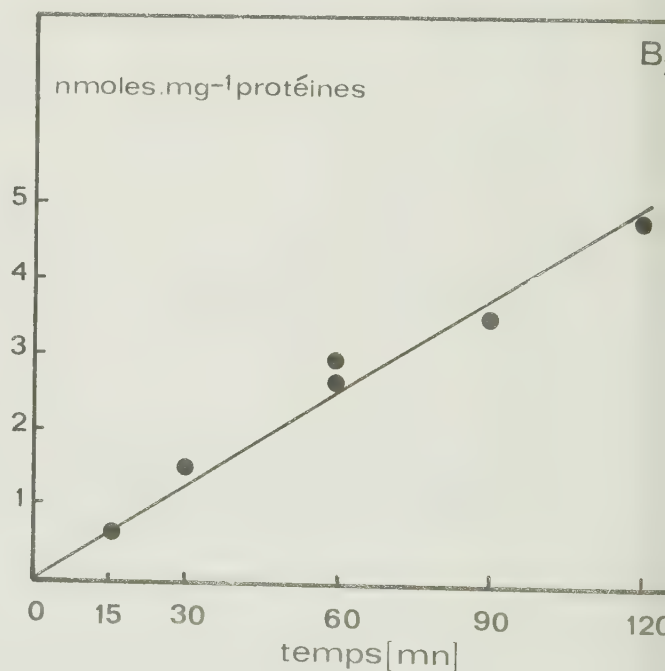
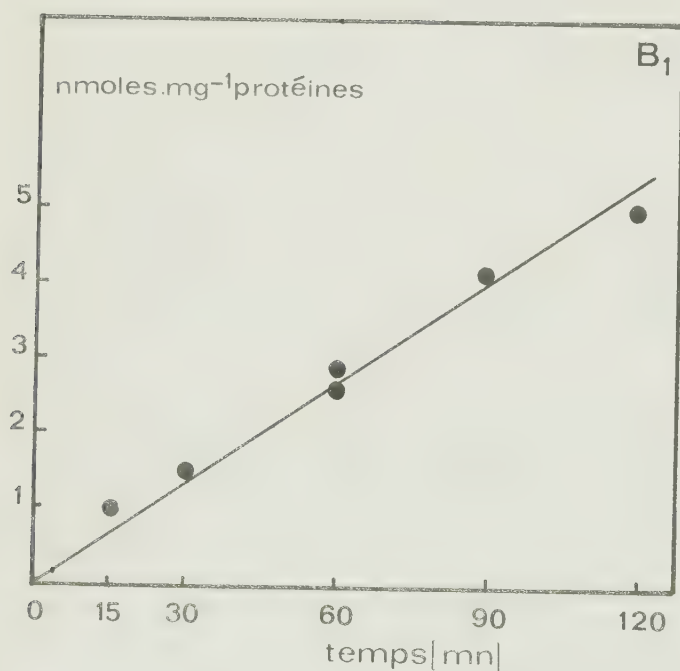
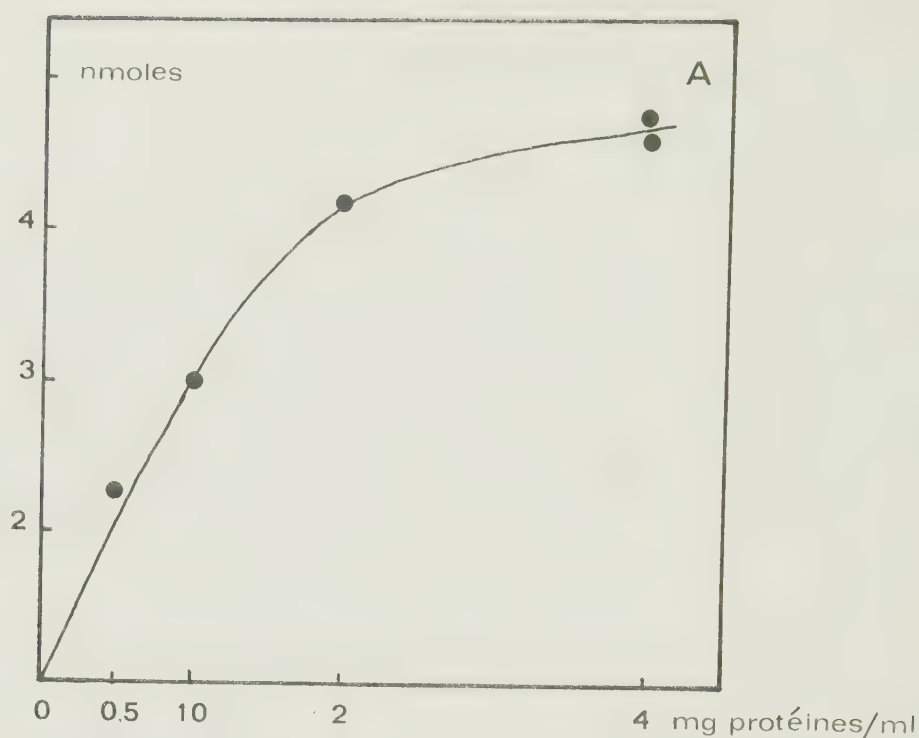


Fig. 37

Incorporation d'acétate marqué dans les acides gras des mitochondries isolées de tranches fraîches (A et B₁) ou en survie (B₂).

A - influence de la quantité de protéines, le temps d'incubation étant fixé à une heure (en ordonnée sont indiquées les nanomoles de précurseur incorporées dans les acides gras)

B₁ et B₂ - cinétique d'incorporation en fonction du temps, à des concentrations en protéines mitochondriales constantes (en ordonnée sont indiquées les nanomoles de précurseur incorporées par mg de protéine

le "contrôle respiratoire" des mitochondries isolées garde une valeur assez élevée (entre 2,5 et 3), ce qui exclut des dégradations très importantes des membranes en cours d'incubation.

a₃ - Influence de la quantité de protéines.
.....

Pour un temps déterminé d'incubation, nous avons étudié l'influence de la quantité de protéines mitochondriales (tissu frais) introduite dans la fiole d'expérience ; l'intensité de l'incorporation varie de façon sensiblement linéaire pour des concentrations faibles, puis atteint un plateau pour des concentrations en protéines voisines de 4 mg/ml, dans un volume final de 4 ml (*Fig. 37*).

L'influence de la quantité de protéines joue donc un rôle important dans ces expériences; MUDD et STUMPF (1961) signalent de même un plateau pour les valeurs proches de 1,5 mg/ml ; ils attribuent ce phénomène à l'existence probable d'un inhibiteur qui serait efficace à concentrations élevées ; le même palier est atteint pour des concentrations variant de 2,48 à 4,71 mg/ml avec des mitochondries de Lupin (MAZLIAK et al., 1972) ; par contre ces auteurs avec des mitochondries de Chou-fleur signalent une relation linéaire jusqu'à 7 mg/ml entre la quantité de protéines présente dans le milieu et l'incorporation de l'(1-¹⁴C)-acétate.

a₄ - Effet des cofacteurs.
.....

Nous ajoutons dans la fiole d'expérience, de l'ATP, du Coenzyme A, du chlorure de magnésium, du NADPH et du succinate de sodium. La nécessité de ces cofacteurs avait été démontrée dans les mitochondries de mésocarpe d'Avocat (MUDD et STUMPF, 1961) et de Chou-fleur (MAZLIAK et al., 1972). L'examen du tableau XXVII révèle que le rythme des synthèses dépend de la présence d'un substrat respiratoire (ici le succinate) et de l'ATP. Le retrait du coenzyme A ou du nucléotide réduit ne semble pas altérer l'intensité des synthèses.

La nécessité du succinate pour le bon fonctionnement des synthèses lipidiques a été trouvée par MAZLIAK sur les mitochondries de Chou-fleur (1968), puis confirmée par DOUCE (1970) qui a montré que l'incorporation

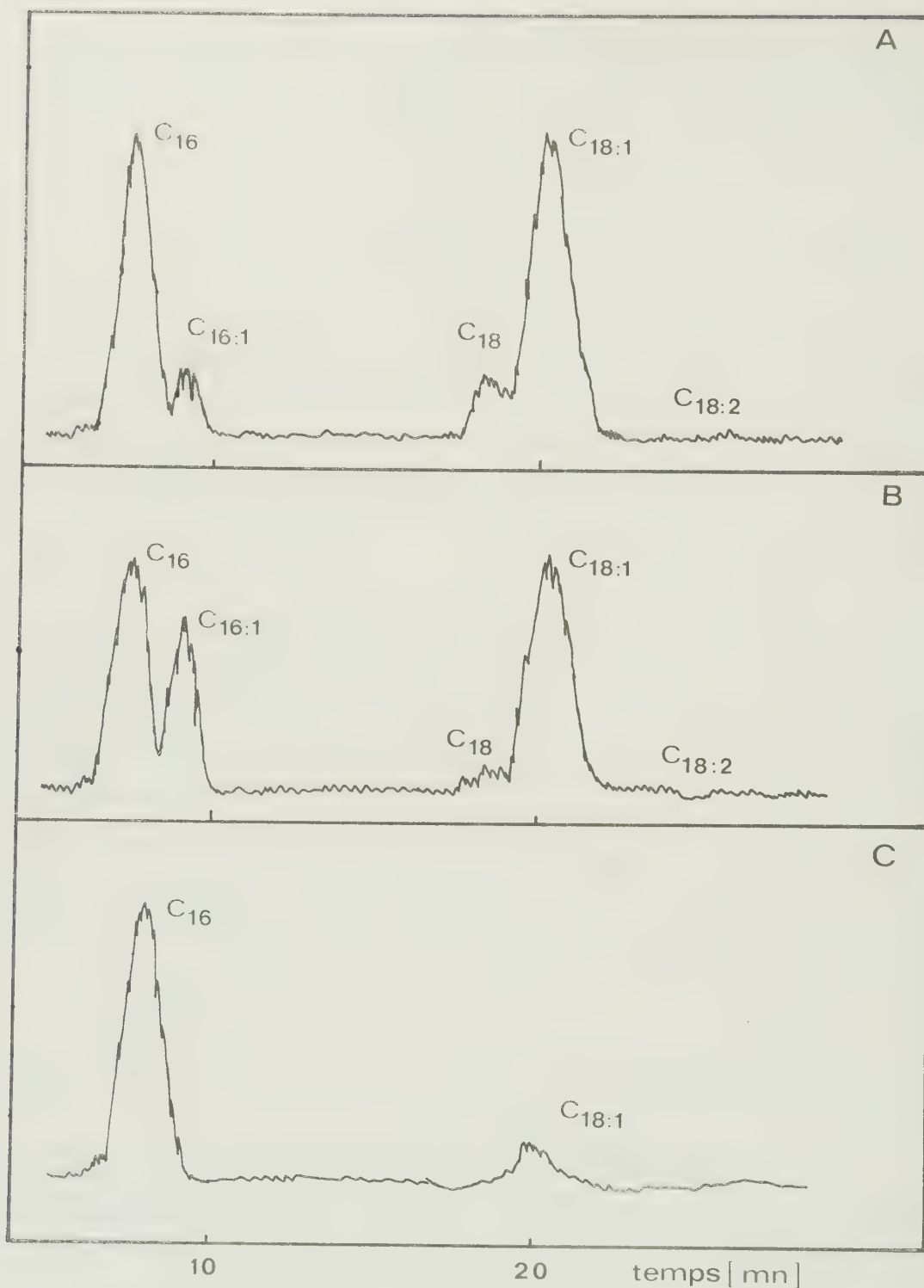


Fig. 38

Incorporation de l'acétate marqué dans les mitochondries isolées de tranches fraîches.

- A : forte concentration en protéines (4 mg/ml)
- B : faible concentration en protéines (0,5 mg/ml)
- C : atmosphère d'azote

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

du (^{32}P)-phosphate de sodium dans les mitochondries de Chou-fleur nécessitait la présence d'un substrat respiratoire. Certains auteurs (HULSMANN et al., 1960, WHEREAT et al., 1967, MATSUMOTO et al., 1962) travaillant sur des mitochondries animales, avaient d'ailleurs émis l'hypothèse que le succinate jouait à la fois le rôle de substrat respiratoire pour la production de composés riches en énergie et d'agent réducteur de NADPH endogène, grâce à un transfert inverse des électrons de la chaîne respiratoire.

La nécessité de l'ATP confirme que les mécanismes étudiés exigent de l'énergie. DOUCE (1970) retrouve un même effet de l'ADP: celui-ci stimule l'incorporation du (^{32}P)-phosphate dans les mitochondries isolées de Chou-fleur. L'anaérobiose altère, elle aussi, les synthèses lipidiques.

Le coenzyme A et le NADPH ne semblent avoir aucun effet ; on peut attribuer cela à la présence endogène de ces cofacteurs.

b) Nature des acides gras synthétisés par les mitochondries isolées.

Par radiochromatographie en phase gazeuse, nous avons déterminé la nature des acides gras synthétisés par les mitochondries isolées de tranches fraîches ou de tranches en survie.

b₁ - Mitochondries isolées de tranches fraîches.
.....

Comme le montrent nettement les radiochromatogrammes (Fig. 38), les acides gras synthétisés sont surtout les acides saturés (acides stéarique et palmitique) et monoinsaturés (hexadécénoïque et octadécénoïque). Nous n'observons jamais de synthèse significative des acides *linoléique* et *linoléinique*.

La concentration en protéines mitochondriales dans le milieu influe sur l'importance relative des acides synthétisés :

- faible concentration en protéines. Lorsque le milieu renferme une faible concentration en protéines mitochondriales par ml (0,5 mg), les acides gras synthétisés sont les acides *palmitique* et *stéarique* et les acides gras monoinsaturés *hexadécénoïque* et *octadécénoïque*.

En pourcentage de radioactivité totale, les acides *palmitique* et *octadécénoïque* sont les acides gras les plus marqués, les deux autres étant fai-

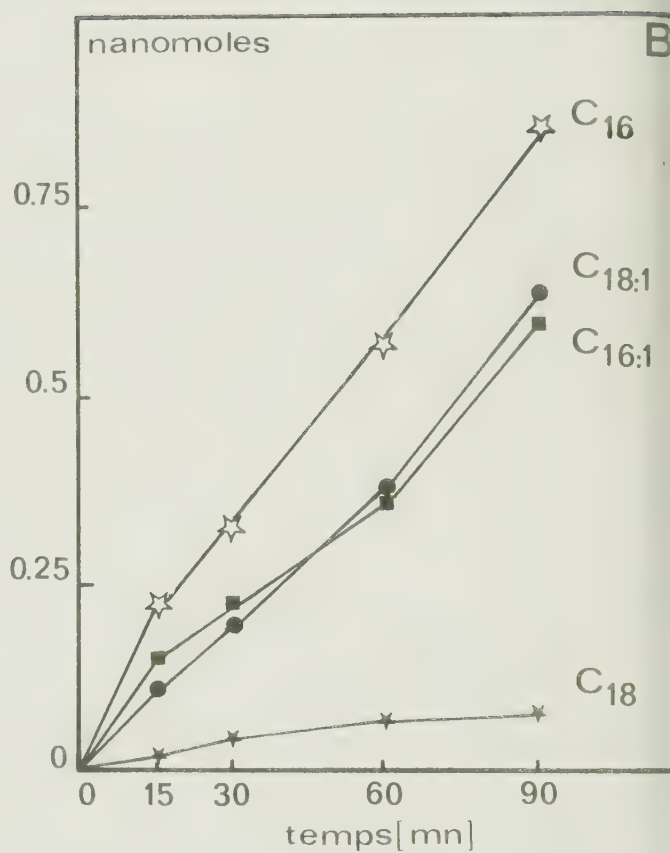
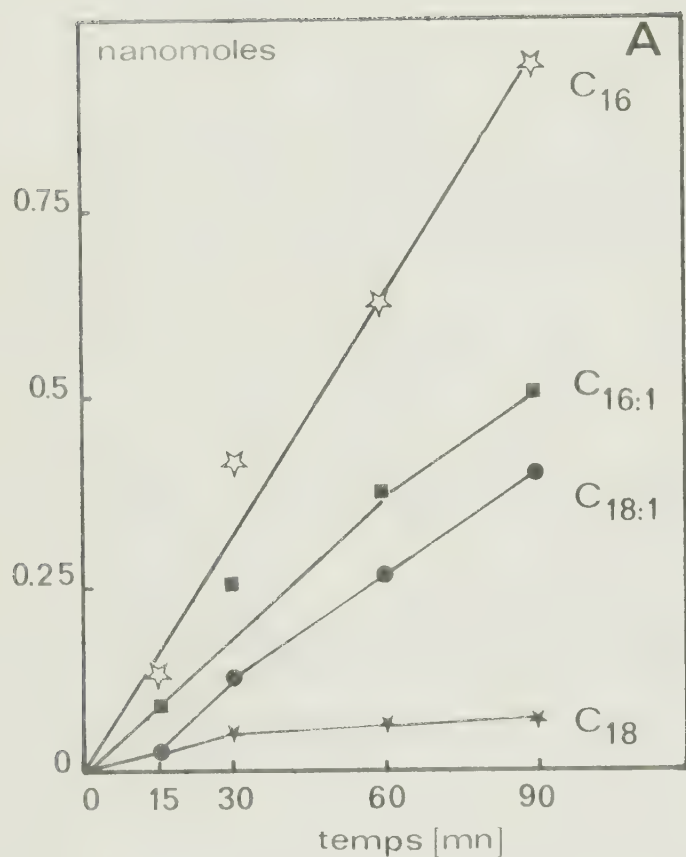


Fig. 39

Incorporation de l'acétate marqué (en nanomoles par mg de protéines) dans les acides gras des mitochondries isolées de tranches fraîches (A) ou en survie (B) ; la concentration en protéines mitochondriales (4 mg /ml) est élevée.

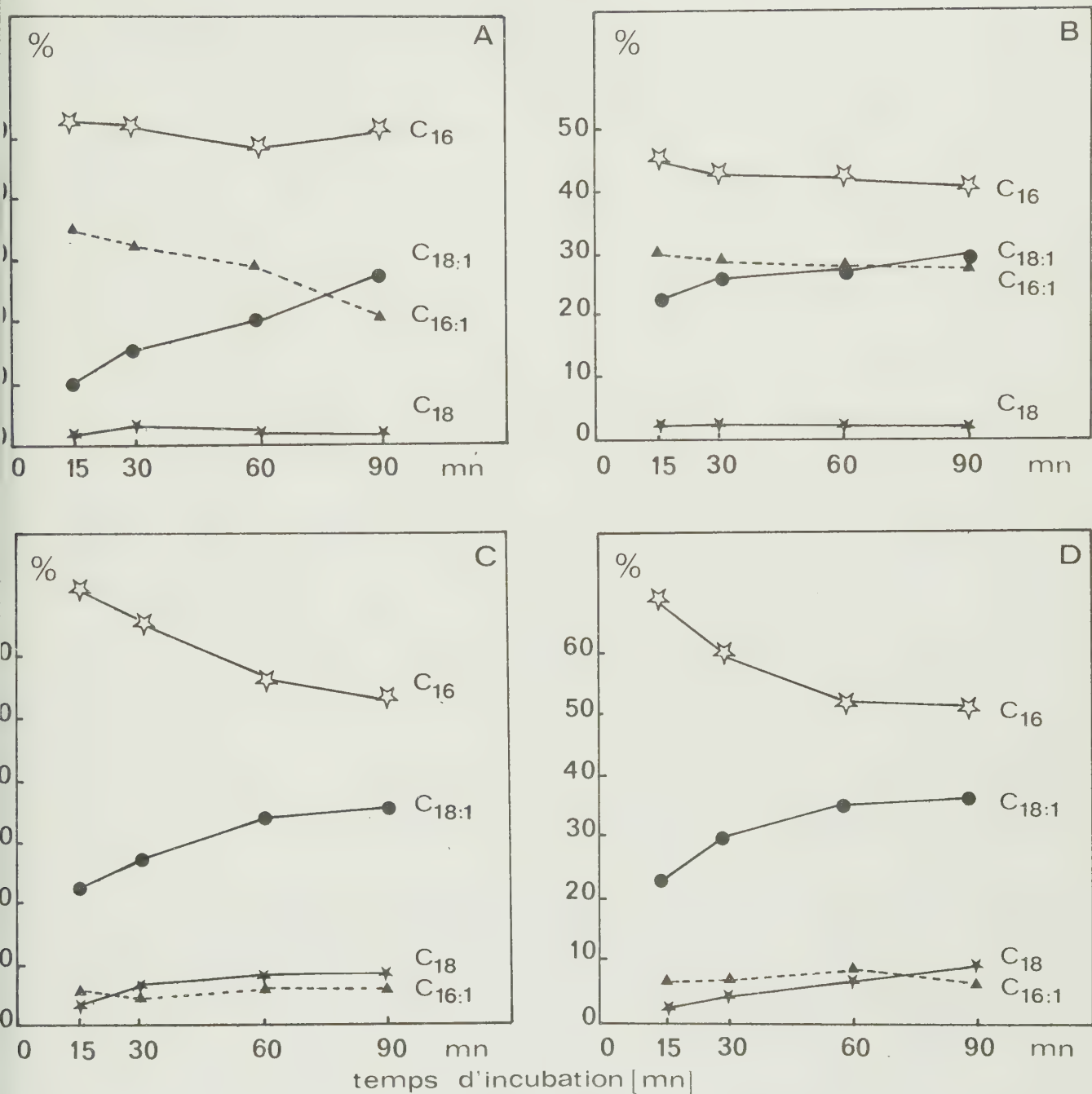


Fig. 40

Incorporation de l'acétate marqué dans les acides gras des mitochondries isolées de tranches fraîches (A et C) et en survie (B et D).

En A et B , les concentrations en protéines mitochondriales sont fortes.

En C et D , les concentrations en protéines mitochondriales sont faibles.

On a porté en ordonnée les pourcentages de radio-activité retrouvés dans les acides gras.

TABLEAU XXVIII

Biosynthèse des lipides par les mitochondries isolées de tubercule de Pomme de terre.

Les conditions de fourniture de $1'(1-^{14}\text{C})$ -acétate sont indiquées dans le texte.

	% de radioactivité totale retrouvés dans les phospholipides des mitochondries isolées après 60 mn d'incubation <i>in vitro</i> en présence du précurseur	
	Mitochondries isolées de Tissue frais	Tissue en survie
PI	1,6	4,0
PC	8,1	12,6
PG	20,0	15,8
PS	2,2	2,5
PE	57,6	54,6
DPG	1,5	1,5
PA	2,6	1,3

blement radioactifs (*Fig. 39 et 40*).

- forte concentration en protéines. Lorsque la quantité de protéines mitochondriales est plus élevée (4 mg/ml), on observe un marquage plus intense de l'acide hexadécénoïque qui représente jusqu'à 30% de la radioactivité totale. On observe peu de modifications des proportions respectives des autres acides gras (*Fig. 39, 40*).

b₂ - Mitochondries isolées de tranches en survie.

Les différences sont minimales entre les résultats obtenus avec des mitochondries isolées de tranches en survie ou de tranches fraîches.

En particulier, l'acide *linoléique* n'est jamais synthétisé dans ces mitochondries isolées. Alors que, comme nous l'avons vu, les mitochondries incubées *in vivo* dans des tranches en survie contenaient de l'acide *linoléique* marqué.

Cette absence de synthèse de l'acide *linoléique* confirme les capacités limitées des biosynthèses lipidiques mitochondriales.

c) Nature des phospholipides où s'insèrent les acides gras synthétisés.

Il était intéressant de rechercher où s'insèrent les acides gras nouvellement synthétisés. Pour cela, nous avons séparé l'extrait lipidique brut mitochondrial, obtenu après incubation des mitochondries en présence d'(1-¹⁴C)-acétate, par chromatographie sur papier silicé ou sur couche mince.

Ainsi que le tableau XXVIII le montre, les phospholipides les plus radioactifs sont surtout la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol. La phosphatidylcholine est très faiblement marquée. La phosphatidyléthanolamine contient près de 54 à 57% de la radioactivité des phospholipides totaux.

L'insertion préférentielle des acides gras synthétisés par les mitochondries dans la phosphatidyléthanolamine et non dans le phospholipide le plus important en masse, la phosphatidylcholine, indique que les biosynthèses effectuées dans les mitochondries sont des synthèses incomplètes. Par contre,

dans les mitochondries marquées *in vivo*, c'est dans la phosphatidylcholine que le maximum de radioactivité est observé.

CONCLUSIONS.

Les mitochondries isolées de tranches fraîches ou de tranches en survie peuvent synthétiser des acides gras saturés ou monoinsaturés ; cette synthèse est certainement mitochondriale et ne peut être expliquée par une contamination par les fractions microsomales qui, nous le verrons plus loin, sont incapables d'incorporer l'(1-¹⁴C)-acétate dans leurs acides gras.

La biosynthèse d'acides gras par les mitochondries dépend de processus énergétiques et de la concentration en protéines mitochondriales dans le milieu. L'effet des fortes concentrations protéiques peut être dû à l'existence d'inhibiteurs hypothétiques, actifs à fortes concentrations ou, plus simplement, à l'anaérobiose provoquée par l'absorption active d'oxygène par les mitochondries.

Les acides gras synthétisés par les mitochondries isolées sont les acides saturés, palmitique et stéarique et les acides monoinsaturés, hexadécénoïque et octadécénoïque.

- l'acide hexadécénoïque a été identifié récemment par la technique de chromatographie sur couche mince de silice fortement chargée de nitrate d'argent, selon la technique de MORRIS et al. (1967) adaptée par GROBOIS (1971). Cette technique permet de séparer les isomères de position selon la position de la double-liaison ; nous avons pu identifier l'acide *hexadécénoïque* comme un acide *palmitoléique* (la double liaison est en position Δ^9).

- l'acide octadécénoïque, étudié selon la même technique, comprend deux isomères, l'acide *oléique* (Δ^9 octadécénoate) et l'acide *cis-vaccénique* (Δ^{11} octadécénoate).

Ces résultats sont en bon accord avec les travaux réalisés sur les mitochondries d'autres tissus végétaux : Pomme, Chou-fleur, Lupin (MAZLIAK et al., 1967, MAZLIAK et al., 1972) et sur des tissus animaux (BARRON, 1966 ; WAKIL, 1970) ; tous ces travaux ont établi que la mitochondrie est dotée d'une capacité de synthèse d'acides gras limitée. Il en est de même pour les synthèses phospholipidiques ; une controverse existe cependant ; selon de nombreux chercheurs, les mitochondries de tissus animaux

seraient seulement capables de former des phospholipides mineurs : WILGRAM et KENNEDY (1963), SCHNEIDER (1963), GURR et al. (1965 a et b), HAJRA et al. (1967), GARBUS et al. (1963), GALLIARD et HAWTHORNE (1963), McCAMAN et COOK (1966), ZBOROWSKI et WOJTCZAK (1969), SCHEPHARD et HUBSCHER (1969), Mc MURRAY et DAWSON (1969) ; selon d'autres travaux, les mitochondries pourraient synthétiser en partie des phospholipides majeurs : STOFFEL et SCHIEFER (1968), BYGRAVE et BUCHER (1968), KAISER (1969).

L'ensemble des résultats obtenus - même dans les cas où une faible synthèse lipidique est notée - nous incite à penser que la capacité limitée de synthétiser des lipides est une caractéristique propre à la mitochondrie, qu'elle soit d'origine végétale ou animale. Cette synthèse limitée de lipides est à rapprocher de la capacité de biosynthèse protéique mitochondriale très limitée. Malgré l'existence de tous les éléments nécessaires à la synthèse protéique : ADN, "mitoribosomes", ARN, cette synthèse est très faible (moins de 10% des protéines mitochondriales totales sont synthétisées par la mitochondrie elle-même). A cette synthèse limitée des protéines, correspond donc une synthèse limitée des phospholipides.

Un autre résultat important de ces recherches sur les mitochondries isolées de tranches en survie est l'absence de synthèse de l'acide *linoléique*, l'acide gras le plus abondant en masse ; nous reviendrons plus loin sur l'intérêt de cette donnée.

2) Biosynthèse des lipides dans les microsomes.

En utilisant les mêmes techniques de mise en incubation et d'analyse, nous avons recherché quels étaient les acides gras synthétisés par les microsomes isolés de tranches de tubercule fraîches ou en survie.

a) Cinétique d'incorporation des précurseurs radioactifs.

Les premières expériences, réalisées sur des microsomes isolés selon la technique habituelle (utilisée pour les mitochondries) et mis en incubation en présence d'(1-¹⁴C)-acétate, n'ont montré aucun marquage des acides gras ; cette non incorporation du précurseur est due très probablement à l'absence d'acétate-thiokinase localisée, comme nous l'avons vu, dans les mitochondries. En effet des biosynthèses d'acides gras peuvent

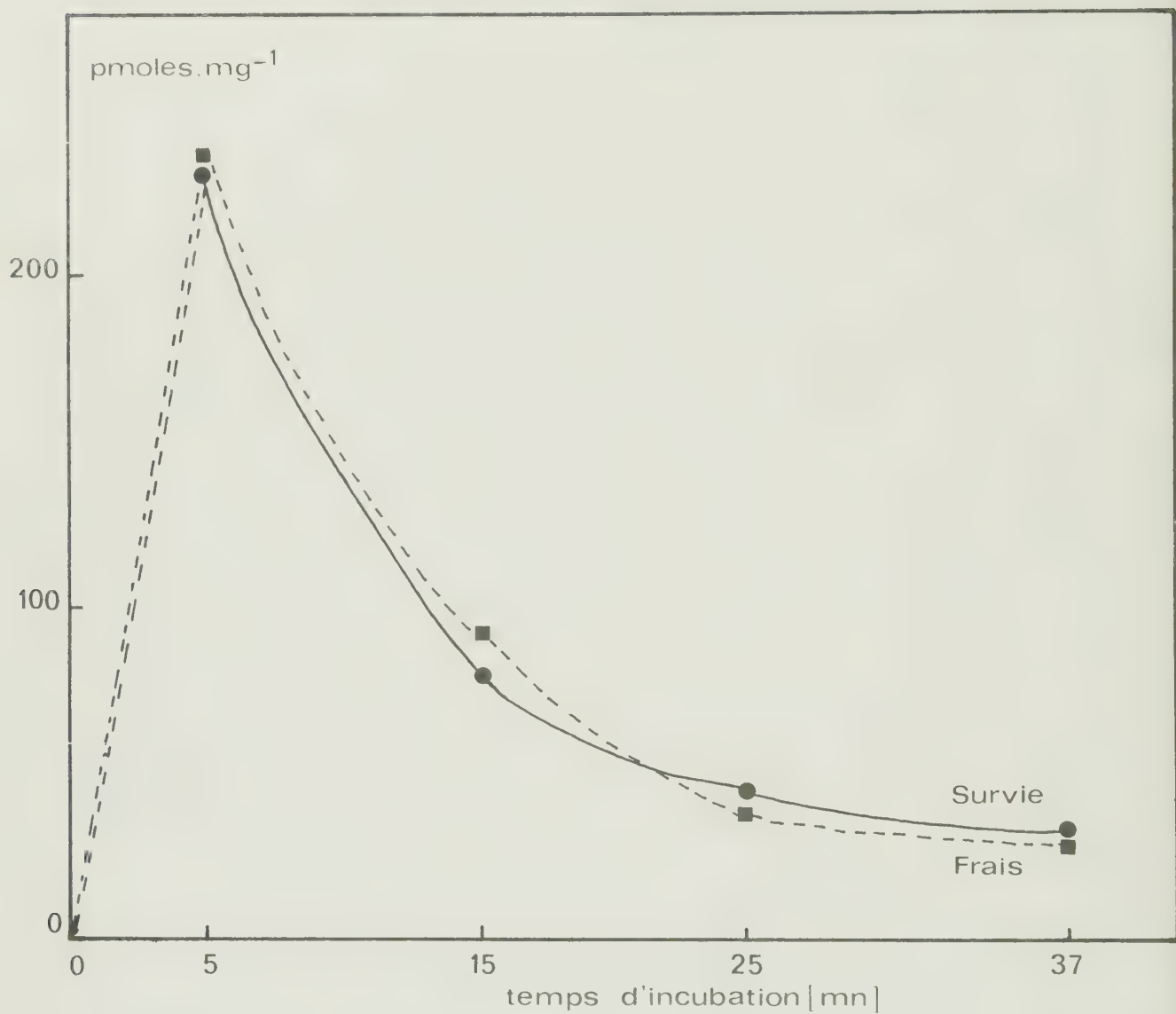


Fig. 41

Biosynthèse des acides gras *in vitro* par les microsomes isolés de tranches fraîches ou de tranches en survie.

Le précurseur radioactif est le (1-¹⁴C) acétyl-CoA (182 nanomoles sont fournies). Les intensités de biosynthèse sont exprimées en picomoles de précurseur incorporées par mg de protéines.

être obtenues dans les microsomes isolés, à partir d'(1-¹⁴C)-acétyl-coenzyme A comme précurseur.

Les premiers succès en ce domaine ont été obtenus récemment grâce à l'utilisation combinée du nouveau précurseur et la mise en oeuvre d'une technique utilisant un milieu de broyage riche en magnésium (10 mM de chlorure de magnésium ; cf. Méthodes expérimentales) ; nous avons décrit plus haut les effets du magnésium sur l'association des ribosomes aux membranes, lors du fractionnement cellulaire ; on peut penser que le magnésium a des effets bénéfiques sur les caractéristiques biochimiques des fractions microsomales isolées en favorisant une cohésion plus étroite des structures.

Nous avons effectivement obtenu des incorporations appréciables d'(1-¹⁴C)-acétyl-coenzyme A dans les acides gras des microsomes isolés de tranches fraîches ou en survie. Cette incorporation est cependant plus faible que celle des mitochondries : on obtient 0,1 nanomoles incorporées/15 mn/mg de protéines microsomales contre 0,5 à 0,8 nanomoles incorporées/15 mn/mg de protéines mitochondriales. Aucune différence n'est retrouvée entre les microsomes isolés de tranches fraîches ou en survie. La cinétique d'incorporation (Fig. 41) présente, dans les deux cas, une décroissance très rapide de la radioactivité des acides gras dès les 5 premières minutes d'incubation ; ce phénomène peut être expliqué de deux façons :

1) une *dégradation* très rapide des systèmes enzymatiques présents dans les microsomes se produirait dès les premières minutes, entraînant un arrêt des synthèses. Il faudrait cependant supposer, en plus, que des dégradations touchant préférentiellement les acides gras nouvellement synthétisés se produisent puisqu'il n'y a aucune diminution appréciable de la masse des acides gras des microsomes ; une telle supposition ne peut être rejetée totalement parce que les molécules phospholipidiques insérées dans les membranes présentent des liaisons plus ou moins lâches (PARPART et BALLENTINE, 1952) et il n'est pas impensable que les molécules nouvellement synthétisées, plus faiblement liées, soient davantage soumises aux dégradations. Ne seraient ainsi marqués dans nos expériences *in vitro* que des lipides facilement accessibles, faisant partie en quelque sorte d'une "écorce" membranaire, sans toucher l'architecture profonde de la membrane.

GALLIARD (1970) (1971a) (1971b) a démontré l'existence d'acyl-hydrolases dans le surnageant cytoplasmique de Pomme de terre, dont l'activité lipoxydasique est élevée ; ces hydrolases ne sont inactivées ni par addition d'EDTA, ni d'autres agents inhibiteurs des lipases classiques.

TABLEAU XXIX

Biosynthèse des acides gras par les microsomes isolés de tubercule de Pomme de terre.

Le précurseur radioactif est le (1-¹⁴C)-acétyl-CoA. Les conditions d'incubation sont indiquées dans le texte. Le temps d'incubation est fixé à 15 mn. Dans ce tableau sont rapportés les % de radioactivité totale retrouvés dans les acides gras totaux. Pour comparaison, on a indiqué les résultats obtenus avec l'homogénat total.

	% de radioactivité		
	MICROSOMES		HOMOGENAT
	Tissu frais	Tissu en survie	Tissu en survie
C ₁₆	35,2	29,3	17,5
C _{16:1}	15,3	12,4	3,4
C ₁₈	5,0	10,6	9,0
C _{18:1}	40,8	33,3	38,7
C _{18:2}	<u>3,7</u>	<u>14,3</u>	<u>31,3</u>

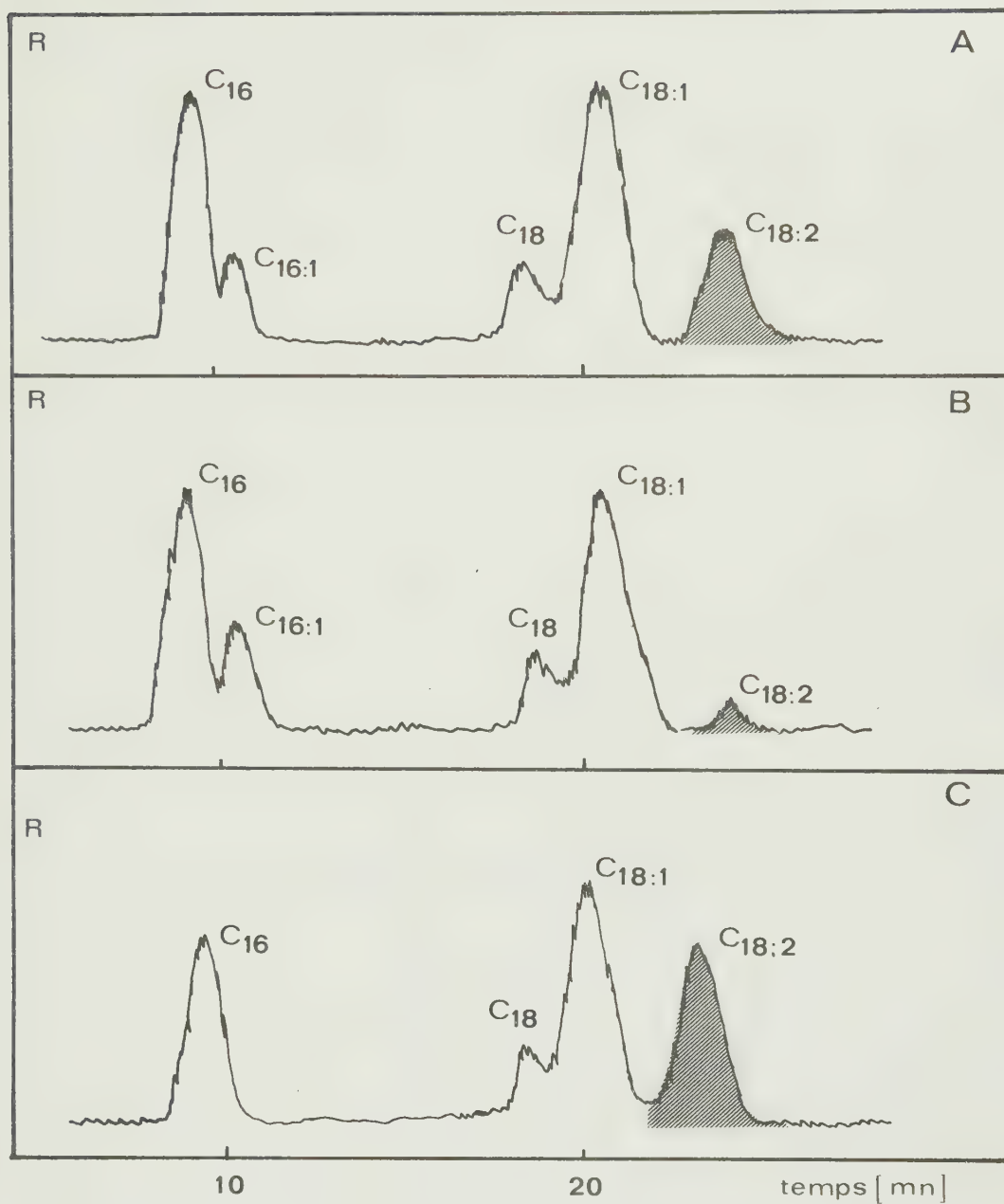


Fig. 42

Biosynthèse des acides gras par les microsomes isolés de tranches en survie (A) ou de tranches fraîches (B) et par l'homogénat entier de tissu en survie (C). Le précurseur radioactif, 1'(1-¹⁴C)-acétyl-CoA est administré pendant 5 mn (A et B) et pendant 15 mn (C). L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

TABLEAU XXX

Etude des capacités de biosynthèse de l'acide linoléique par les fractions cellulaires isolées de tranches en survie.

Le précurseur utilisé est le (1-¹⁴C)-acétyl-coenzyme A.

Centrifugations	Fractions recueillies	% d'incorporation dans l'acide linoléique
Homogénat entier	Homogénat	31,3
120g/5 mn	Grains d'amidon et amyloplast	0
1500g/10 mn	Jeunes plast	0
	peroxysomes, mitochondries	
10.000g/15 mn	Mitochondries	0
100.000g/60 mn	Microsomes	14,3
Surnageant		2,3

Il est évident que l'existence de telles hydrolases à partir de ces microsomes peuvent expliquer de telles dégradations et peuvent inhiber les enzymes impliquées dans les synthèses.

2) *une utilisation* immédiate des lipides nouvellement synthétisés dans des réactions métaboliques ou enzymatiques particulières. Les lipides néoformés pourraient s'insérer étroitement dans certains complexes enzymatiques (insertion qui rendrait difficile ensuite l'extraction) ou intervenir comme intermédiaires dans certaines réactions métaboliques lipidiques ; dans ce dernier cas, les cinétiques s'expliqueraient ; des cinétiques semblables sont obtenues en suivant l'incorporation de CDP-diglycéride ou de (^{32}P)-phosphate dans les lipides des mitochondries de Chou-fleur (SUMIDA et MUDD, 1968) (DOUCE, 1970).

Comment expliquer que la capacité de synthèse des microsomes isolés après survie ne soit pas plus élevée que celle des microsomes isolés de tissu frais ? On pourrait relier ce phénomène à la grande fragilité des microsomes isolés qui s'illustre, par exemple, par la faible activité de la glucose-6-phosphatase après survie.

b) Nature des acides gras synthétisés.

L'analyse par radiochromatographie en phase gazeuse révèle que les acides gras synthétisés par les microsomes sont les acides gras saturés et monoinsaturés mais aussi une proportion élevée d'acide *linoléique*, lorsque les microsomes sont *isolés de tissu en survie, exclusivement*.

Cette synthèse d'acide linoléique peut se remarquer dès 15 minutes d'incubation (14,3% de la radioactivité des acides gras totaux) ; en pourcentage de radioactivité, ce marquage de l'acide linoléique *in vitro* est assez comparable aux synthèses notées *in vivo* (Tableau XXIX) (Fig. 42).

Quelques expériences ont consisté à préparer un broyat cellulaire de tissu en survie ; dans un milieu riche en magnésium, puis en procédant à des centrifugations fractionnées de ce broyat, on recueille différentes zones cellulaires. Ces fractions sont ensuite mises en incubation en présence d'($1-^{14}\text{C}$)-acétyl-Coenzyme A (afin de pallier l'éventuelle absence de la thiokinase). Le tableau XXX montre que l'homogénat est capable de réaliser la synthèse de l'acide *linoléique* ; cette capacité de biosynthèse est due

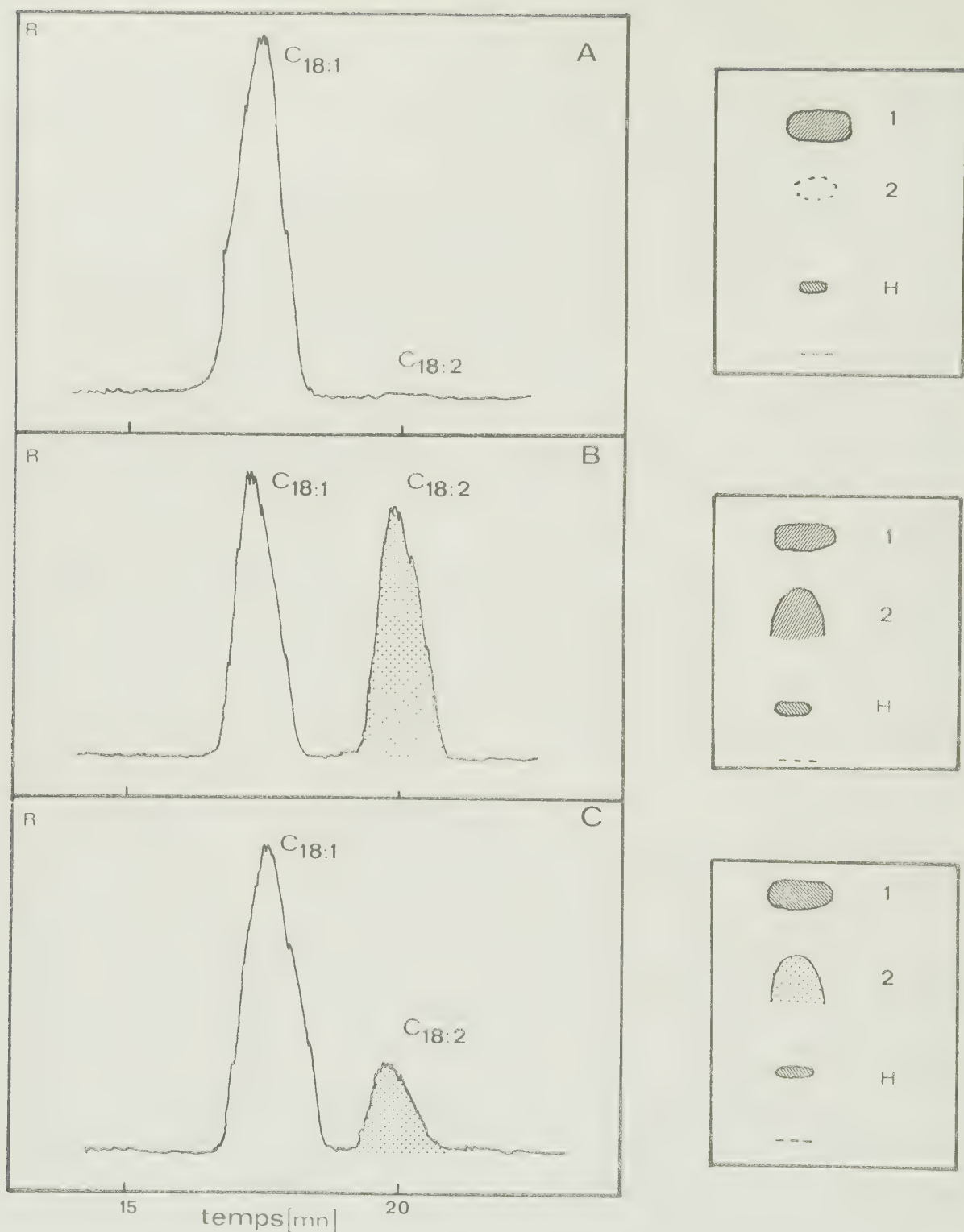


Fig. 43

Désaturation *in vitro* de l'oléyl-coenzyme A par les microsomes isolés de tranches en survie (B). On a représenté à gauche des portions de radiochromatogrammes en phase gazeuse et, à droite, des autoradiogrammes sur couche mince de silice-nitrate d'argent.

Les microsomes isolés de tranches fraîches sont incapables d'une telle désaturation (A). Quand la survie a lieu au froid, la capacité de désaturation est fortement diminuée (C).

Abréviations : 1 = monoènes ; 2 = diènes ; H = probablement hydroxyacides.

à la fraction microsomale qui est la seule à posséder une capacité appréciable de biosynthèse de cet acide gras. Aucun marquage important de l'acide linoléique n'est observé dans les autres fractions cellulaires. Dans certaines expériences, une synthèse d'acide linoléique a été trouvée dans la fraction 1500 g, mais les résultats, n'ayant pas été obtenus d'une façon reproductible, ont été écartés.

Dans les microsomes isolés de tissus frais, par contre, on ne retrouve pas une telle synthèse d'acide linoléique, active dans les microsomes isolés de tissus en survie. Ceci montre que les systèmes enzymatiques responsables de la synthèse d'acide linoléique sont effectivement inactifs *in vitro* dans les fractions cellulaires isolées des tissus frais.

3) Etude de l'oléyl-Coenzyme A désaturase au cours de la survie.

Les résultats des expériences *in vivo* d'une part, (montrant l'existence d'une désaturation de l'acide oléique en acide linoléique, particulièrement dans les microsomes), et des expériences *in vitro*, d'autre part, indiquant que les microsomes sont capables de synthétiser l'acide linoléique à partir d'acétyl-Coenzyme A, nous ont conduit à étudier *in vitro* la désaturation de l'oléyl-Coenzyme A radioactif par les microsomes isolés de tissu en survie.

a) Protocole expérimental.

On met dans un tube à essai 0,2 ml de suspension microsomale (isolée de 2,5 g de rondelles préalablement maintenues en survie), 5 nanomoles d'(1-¹⁴C)-oléyl-Coenzyme A (52, 1 mCi . nmol⁻¹), 1 μ mole de chlorure de magnésium et 10 mg de sérum albumine de Boeuf dans un volume final de 1 ml de solution de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2. L'ensemble est maintenu à 25°C en agitation violente pendant une heure.

A la fin de l'incubation, on ajoute au contenu du mélange réactionnel 5 ml de soude méthanolique 0,5 N et on place le tube à essai, après l'avoir bouché, à 70°C pendant 30 minutes. On ajoute ensuite 3 ml de méthanol BF₃ et on remet le tube à 70°C pendant 15 minutes. Les esters méthyliques

TABLEAU XXXI

Désaturation *in vitro* de 1'(1-¹⁴C)-oléyl-coenzyme A par les microsomes isolés de tranches préalablement maintenues 16 heures en survie.

Les conditions d'incubation sont expliquées dans le texte.

Dans ce tableau, ont été comparés les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse et sur couche mince de silice-nitrate d'argent. Dans ce dernier type de séparation, il a été noté, de plus, la présence de composés radioactifs qui seraient probablement des hydroxyacides ; ces composés, contenant environ 9% de la radioactivité totale, sont présents dans 1'(1-¹⁴C)-oléyl-coenzyme A de départ et ne sont pas détectés par chromatographie en phase gazeuse.

	CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE
	% de désaturation = % de la radioactivité totale des acides oléique + linoléique, retrouvé dans l'acide linoléique	% de désaturation = % de la radioactivité des monoènes + celle des diènes, retrouvé dans les diènes
Essai témoin	43,4	41,5
Microsomes bouillis	0	0
	Nanomoles d'acide linoléique synthétisées en une heure	Nanomoles d'acide linoléique synthétisées en une heure
Essai témoin	1,13	1,08
Microsomes bouillis	0	0

des acides gras sont ensuite extraits par 10 ml de pentane. Le même tube sert ainsi à l'essai enzymatique, à la saponification, à la méthylation et à l'extraction des acides gras. Les acides gras sont ensuite analysés par radiochromatographie en phase gazeuse ou sur couche mince imprégnée de nitrate d'argent.

Dans certaines expériences, le mélange expérimental n'est pas directement fixé, mais on y ajoute 25 ml de solution tampon froide et on centrifuge le tout pour récupérer les microsomes et ainsi éliminer le précurseur en excès. Le culot microsomal est ensuite traité comme il vient d'être décrit.

b) Résultats.

Lorsque l'expérience est effectuée sur des microsomes isolés de tranches maintenues en survie pendant 12 heures par exemple, l'analyse par radiochromatographie en phase gazeuse ou en couche mince montre que l'(1-¹⁴C)-oléyl-Coenzyme A est activement désaturé en acide *linoléique* : cet acide gras contient plus de 40% de la radioactivité retrouvée dans les esters méthyliques des acides gras après une heure d'incubation (*Fig. 43*) (*Tableau XXXI*). Ce résultat permet une étude de l'activité de l'oléyl-Coenzyme A désaturase associée aux tissus en survie et particulièrement aux microsomes de ces tissus ; nous avons par conséquent étudié les propriétés biochimiques, la localisation intracellulaire de cette activité enzymatique et l'influence du temps et des conditions de survie (BEN ABDELKADER, 1972 ; BEN ABDELKADER et al., 1972)

b₁ - Propriétés enzymatiques.

Influence des conditions d'incubation sur la désaturation.

Les conditions d'aérobiose - réalisées par agitation ou par injection d'air comprimé - sont indispensables pour effectuer la désaturation *in vitro* (*Tableau XXXIII*). L'injection d'oxygène pur n'augmente pas le pourcentage de désaturation obtenu ; l'injection d'azote dans le milieu d'expérience supprime toute désaturation.

L'addition de sérum albumine de Boeuf à la concentration finale de

TABLEAU XXXII

Stabilisation de l'activité de l'oléyl-coenzyme A désaturase par la sérum albumine.

Dans ces expériences, les microsomes isolés de tranches en survie depuis 16 heures sont remis en suspension dans un milieu sans sérum albumine ou dans un milieu riche en sérum albumine (10mg/ml). Les microsomes sont ensuite mis en incubation dans les conditions décrites par ailleurs, excepté pour la sérum albumine, qui est ajoutée en concentration élevée (exp. A) ou omise (exp. B).

	% de désaturation	Nanomoles linoléate synthétisées en 1 heure	% des acides totaux (masse)				
			C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Essai témoin (microsomes utilisés dès l'extraction) sérum albumine à forte concen- tration	45,2	1,17	24,0	7,8	2,0	47,5	18,4
Microsomes congelés à -20°C et dégelés (24h) + sérum albumine à forte concentration	45,0	1,17	23,5	7,0	3,1	47,0	17,9
Microsomes utilisés dès l'extraction pas de sérum albumine dans l'essai de désatu- ration	3,5	0,09	32,8	10,6	6,0	39,0	11,2

TABLEAU XXXIII

Nécessité de l'oxygène et de pyridine nucléotide pour l'activité de l'oléyl-coenzyme A désaturase des microsomes isolés de tranches de tubercule après 16 heures de survie.

Les conditions expérimentales sont expliquées dans le texte.

Chaque essai enzymatique comprend 1 micromole de chaque nucléotide ; l'absence de nucléotide réduit dans les nucléotides oxydés vendus dans le commerce est vérifié à 340 nm.

	% de désaturation	Nanomoles de linoléate synthétisées en une heure à partir de 2,6 nanomoles d'(1- ¹⁴ C)- oléyl-coenzyme A
AGITATION	37,5	0,97
Barbotage d'air	38,6	1,0
Barbotage d'oxygène	37,8	0,98
Sans agitation	2,5	0,06
Barbotage d'azote	0	0
AGITATION		
Pas de nucléotide	5,2	0,135
NADH	45,0	1,17
NADPH	44,5	1,16
NADH + NADPH	49,2	1,28
NAD	43,5	1,13
NADP	18,9	0,49

TABLEAU XXXIV

Spécificité de l'oléyl-coenzyme A désaturase pour le substrat.

(les microsomes sont isolés de tranches préalablement maintenues 12 heures en survie ; les essais enzymatiques durent une heure).

	% de désaturation	Nanomoles de linoléate synthétisées à partir de 2,6 nano- moles de précurseur
(1- ¹⁴ C)-palmityl-coenzyme A	0	0
(1- ¹⁴ C)-stéaryl-coenzyme A	0	0
(1- ¹⁴ C)-ammonium oléate	0	0
(1- ¹⁴ C)-oléyl-coenzyme A	38,2	1,0

10 mg/ml (10 fois supérieure à celle utilisée habituellement) est nécessaire à la désaturation ; en effet un essai effectué à faible concentration de sérum albumine de Boeuf donne deux indications précieuses : d'une part, le pourcentage de désaturation est pratiquement nul (3,5%), d'autre part, la composition en masse des acides gras microsomaux est bouleversée : les acides *linoléique* et *linoléinique* sont dégradés et représentent un pourcentage beaucoup plus faible (*Tableau XXXII*) alors que les acides gras saturés augmentent parallèlement. Ce changement de composition est dû aux activités hydrolasiques présentes dans le tubercule de Pomme de terre, découvertes dans le surnageant cytoplasmique par GALLIARD (1970) (1971a) et qui s'exaltent dans les microsomes fortement aérés. Le sérum albumine de Boeuf à forte concentration permet de lutter contre cette dégradation et rend possible la désaturation de l'oléyl-Coenzyme A.

La présence d'un pyridine nucléotide est strictement nécessaire à la désaturation. Si l'on omet le NADH du milieu d'incubation, on annule pratiquement la désaturation. On peut remplacer le NADH par le NADPH (*Tableau XXXIII*), ce qui donne le même résultat ; l'addition simultanée des deux nucléotides provoque une légère stimulation. L'addition de NADP oxydé à la place du NADH diminue beaucoup la désaturation, sans l'empêcher totalement (18,9%) ; par contre, il est surprenant de constater que le NADH est remplacé par le NAD^+ sans changer le résultat. Pour expliquer cette observation, on peut supposer l'existence dans les microsomes d'un système de régénération du NADH à partir du NAD^+ ; ce système, particulièrement actif, permettrait aux microsomes de suppléer à l'absence du nucléotide réduit.

Spécificité de l'oléyl-Coenzyme A désaturase.

L'activité désaturasique présente une spécificité marquée pour l'(1- ^{14}C)-oléyl-Coenzyme A. Des essais réalisés avec l'(1- ^{14}C)-oléate d'ammonium, l'(1- ^{14}C)-stéaryl-Coenzyme A ou l'(1- ^{14}C)-palmityl-Coenzyme A ont donné des résultats négatifs (*Tableau XXXIV*).

- Cinétique de la désaturation

La désaturation de l'oléyl-Coenzyme A se produit régulièrement au cours du temps pendant une heure d'incubation (*Fig. 44A*). La courbe présente une inflexion à partir de 30 minutes d'incubation. Le caractère enzymatique de la réaction est renforcé par l'annulation de toute désaturation quand les microsomes sont bouillis (*Tableau XXXI*).

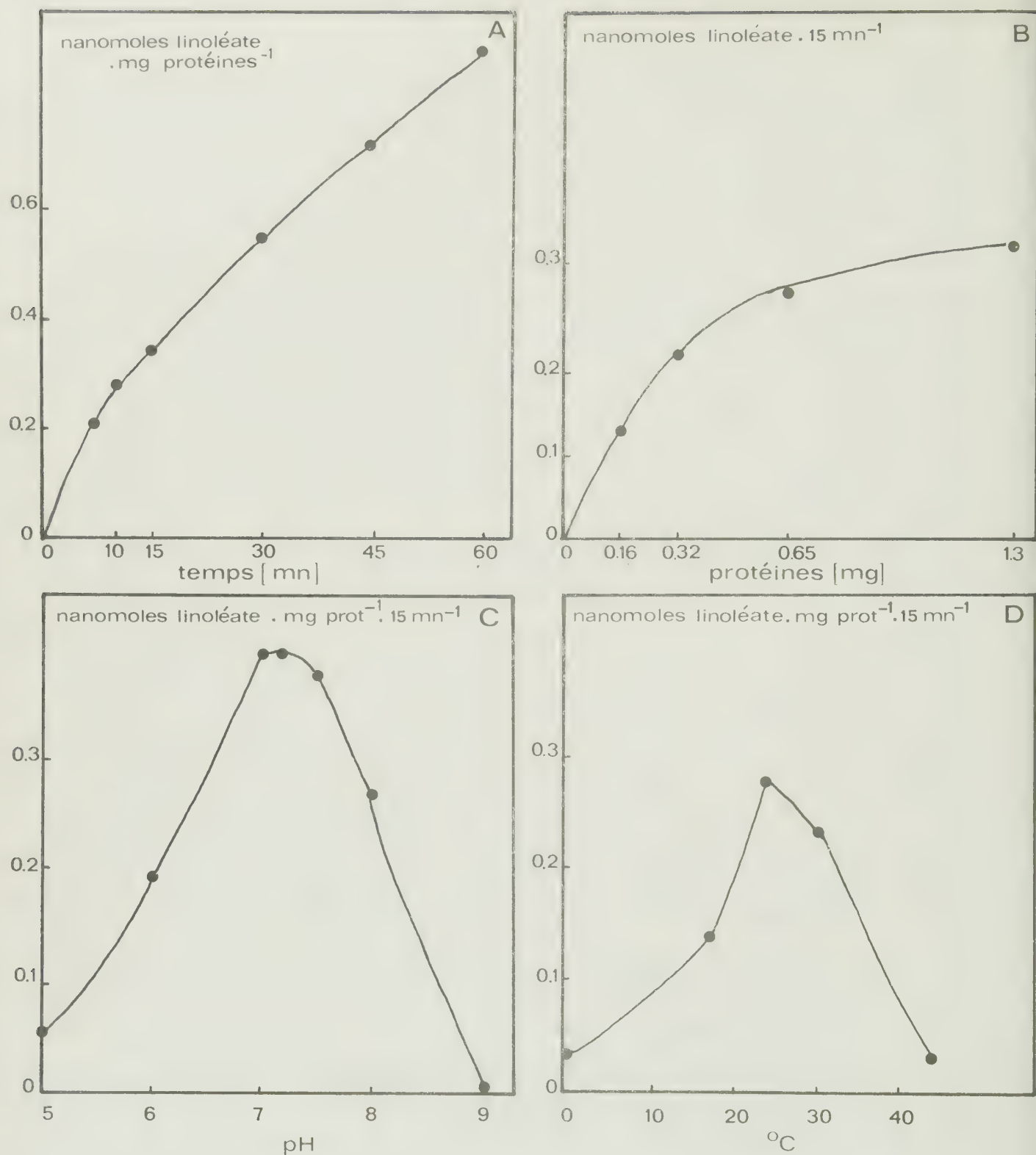


Fig 44

Activité de l'oléyl-coenzyme désaturase microsomale de tranches de tubercule en survie.

- A - Cinétique
- B - Influence de la quantité de protéines
- C - Influence du pH
- D - Influence de la température

- Influence de la quantité de protéines.

La désaturase est très active, même à très faibles quantités de protéines microsomales. Un seuil est obtenu pour de fortes concentrations protéiques (1.3 - 2.6 mg/ml), ce qui peut être expliqué, soit par une concentration élevée en un inhibiteur de la désaturation, soit par la saturation du substrat. Dans nos expériences ultérieures, nous avons utilisé la concentration maximum de 1,3 mg/ml (*Fig. 44B*).

- Influence du pH.

L'activité maximum de l'oléyl-Coenzyme A désaturase est observée à un pH aux environs de 7,0 à 7,2 (*Fig. 44C*).

- Influence de la température.

La température la plus favorable se situe aux alentours de 25°C. A plus basse température l'activité n'est pas négligeable. A 0°C, l'activité désaturasique est cependant très faible (*Fig. 44D*).

- Influence de la concentration en oléyl-Coenzyme A.

Le pourcentage de désaturation est constant, quelle que soit la concentration en oléyl-Coenzyme A, dans la gamme allant de 0,016 μM à 32,5 μM , ce qui signifie que le système enzymatique n'est saturé à aucune de ces concentrations. La quantité d'acide *linoléique* synthétisé augmente donc régulièrement en fonction de la quantité de substrat fourni, comme le montre le graphique (*Fig. 45*) représentant la vitesse de la réaction de désaturation (en nanomoles d'acide *linoléique* synthétisées par mg de protéines en une heure) en fonction de la quantité d'oléyl-Coenzyme A. En représentant l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration d'oléyl-Coenzyme A (technique de LINEWEAVER et BURK), on peut calculer la valeur du K_M apparent du système enzymatique; la valeur obtenue est de 25 μM , supérieure à celle obtenue pour la désaturation du stéaryl-Coenzyme A par les microsomes de levure (2,8 μM) (SCHULTZ et LYNEN, 1971) ; aucune valeur de K_M apparent n'a été publiée, à notre connaissance, pour la désaturation de l'oléyl-Coenzyme A.

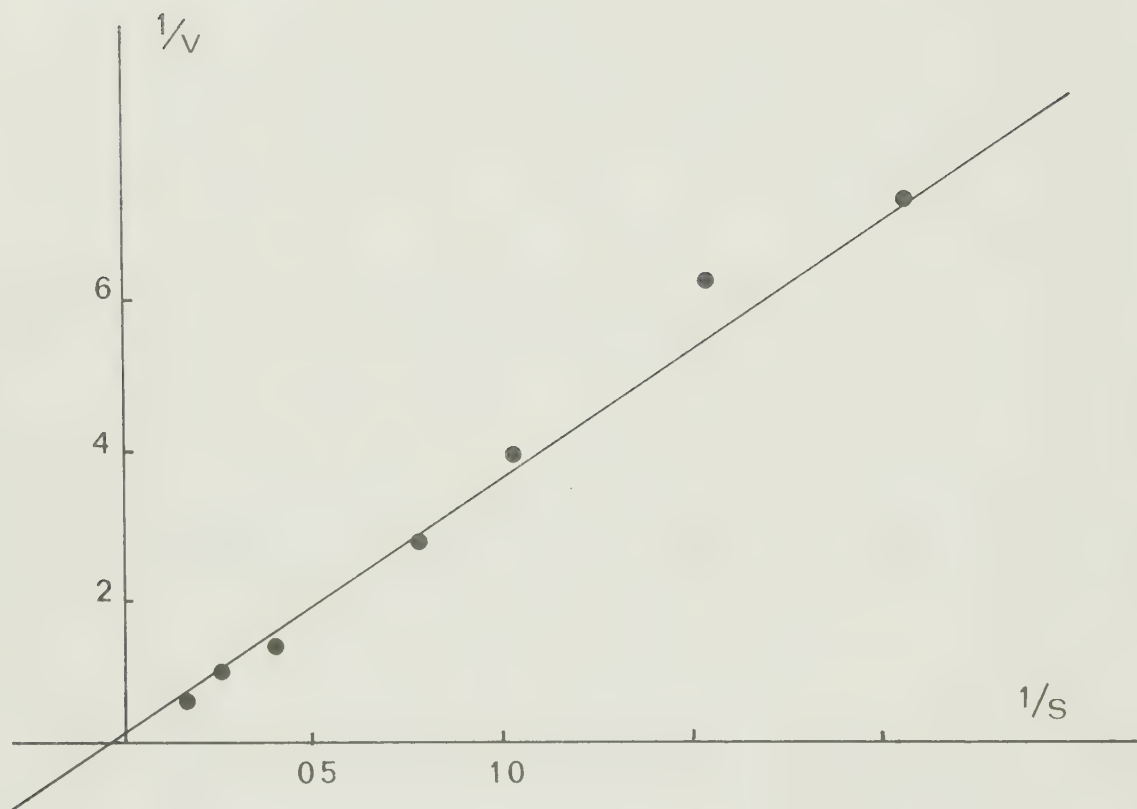


Fig. 45

Effet de la concentration de l'oléyl-coenzyme A sur l'activité de l'oléyl-coenzyme A désaturase des microsomes isolés de tranches en survie. Les données ont été traitées selon la méthode de Lineweaver-Burke. $1/V$ est exprimé en $1/\text{nanomoles}$ de linoléate synthétisé par mg de protéines et par 15 mn , $1/S$ en $1/\mu\text{M}$ d'oléyl-coenzyme A.

b₂ - Localisation intracellulaire.

Une fois connues les propriétés enzymatiques de l'oléyl-Coenzyme A désaturase associée aux microsomes, il était alors possible de rechercher si cette activité désaturasique peut se retrouver dans d'autres fractions cellulaires et, en particulier, dans les mitochondries isolées de tranches de survie.

Si l'on examine les capacités de désaturation des fractions brutes recueillies après centrifugation fractionnée à partir d'une même quantité de tissu, on trouve que les fractions microsomales recueillies à 100.000 g pendant une heure ont la plus haute activité désaturasique (44%) (Fig. 46) ; les pourcentages de désaturation obtenus avec les autres fractions cellulaires, centrifugées respectivement à 120 g/5 mn (riche en débris, noyaux et jeunes plastes), 1500 g/10 mn (contenant des plastes et des mitochondries) et 10.000 g/15 mn (comprenant des mitochondries) sont plus faibles, mais non négligeables, respectivement : 24,5 - 23,5 - et 24%. Le surnageant n'a aucune activité. Si l'on exprime les capacités de désaturation par rapport à la quantité de protéines, la différence s'accroît très fortement ; lorsque 2,6 nanomoles d'(1-¹⁴C)-oléyl-Coenzyme A sont fournies, 1,35 nanomoles d'acide *linoléique* sont obtenues pour 1 mg de protéines microsomales, en une heure (Fig. 46), alors que 0,15 - 0,14 et 0,21 nanomoles sont respectivement synthétisées par 1 mg de protéines des fractions 120 g, 1500 g, et 10.000 g.

Cette expérience suggère fortement une localisation microsomale de l'oléyl-Coenzyme A désaturase. Il existe cependant une activité non négligeable dans les autres fractions et, en particulier, dans les mitochondries ; cette activité est très probablement due à une contamination des fractions brutes par des membranes microsomales ; les examens en microscopie électronique nous ont révélé en effet l'hétérogénéité des fractions brutes, surtout quand elles sont isolées en milieu de broyage riche en magnésium ; en particulier, il existe des sphères microsomales hérissées de ribosomes dans toutes les fractions examinées (cf. études cytologiques). Pour étudier d'une façon satisfaisante les activités désaturasiques des fractions plus lourdes que les microsomes, nous avons procédé à des séparations des culots mitochondriaux bruts sur gradient de saccharose. Comme le montre la figure 46, les mitochondries se rassemblent en une bande très nette correspondant à la densité 1,19 environ, en accord avec les déterminations précédem-

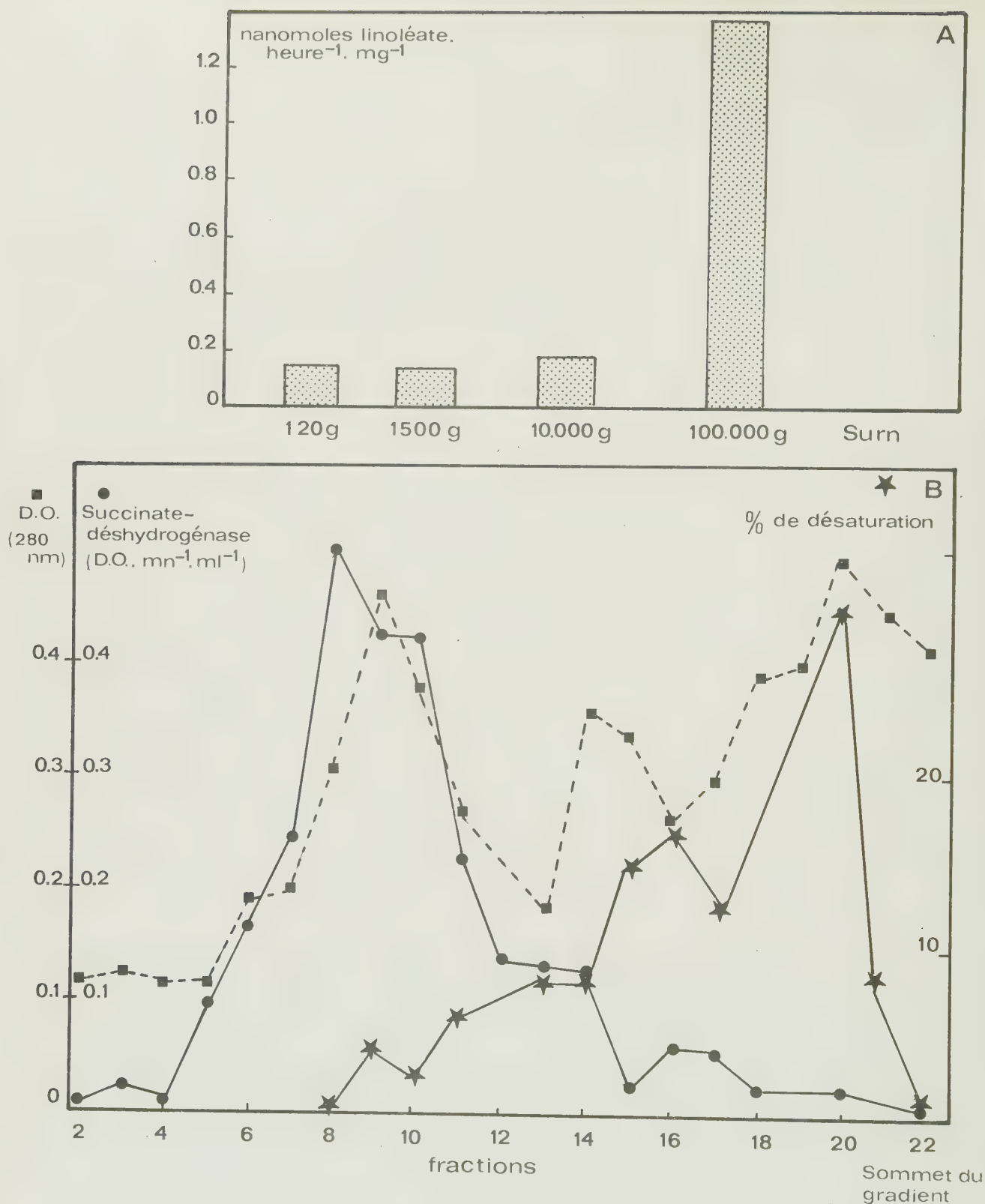


Fig. 46

Localisation intracellulaire de l'oléyl-coenzyme A désaturase de tranches en survie.

A - Centrifugation différentielle. Les activités enzymatiques sont exprimées en nanomoles de linoléate synthétisées par heure et par mg de protéines.

B - Centrifugations en gradient de saccharose. Pour chaque fraction collectée, on a dosé les protéines par lecture au spectrophotomètre à 280 nm, on a mesuré l'activité de la succinate déshydrogénase (en D.O. par mn et par ml de fraction collectée) et l'activité de l'oléyl-coenzyme A désaturase (en % de désaturation).

ment décrites ; cette bande présente l'activité succinate-déshydrogénasique la plus élevée (*Fig. 46*), ce qui confirme parfaitement les expériences antérieures attribuant à cette bande une activité oxydative importante pour le succinate (et une activité NADH-cytochrome c-réductasique sensible à l'antimycine A). Contrastant avec ces activités enzymatiques élevées (qui montrent que la bande, très pure, contient des mitochondries en bon état physiologique), l'activité oléyl-Coenzyme A désaturase y est nulle ou négligeable. Les bandes plus légères du gradient contiennent des membranes microsomales, à en juger par leur couleur jaune caractéristique, leur absence d'activité succinate-déshydrogénasique et leur activité intense NADH cytochrome c réductasique ; l'oléyl-Coenzyme A désaturase y est très active. On peut donc en conclure que toute l'activité désaturasique du culot mitochondrial est associée à des membranes microsomales contaminantes. Cependant deux remarques sont à faire ; d'une part la membrane externe mitochondriale peut contenir une certaine activité désaturasique, d'autre part les membranes mitochondriales peuvent être imperméables à l'oléyl-Coenzyme A.

Cette expérience confirme la localisation microsomale de l'oléyl-Coenzyme A désaturase à l'intérieur de la cellule et montre que les mitochondries isolées sont incapables de synthétiser leur acide *linoléique*.

b₃ - Induction au cours de la survie.

Toutes les expériences que nous venons de décrire ont porté sur des fractions isolées de tranches en survie. Il s'imposait de faire le même travail dans les tissus frais afin de savoir si l'absence de désaturation *in vivo* est due au fait que l'oléyl-Coenzyme A désaturase, préexistante dans les tranches fraîches, est réprimée *in vivo*, ou bien si cette désaturation *in vivo* correspondait à une réelle induction de la désaturase.

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que la deuxième hypothèse est valable ; en effet les microsomes isolés de tissu fraîchement prélevé (*Fig. 47*) sont incapables de désaturer l'(1-¹⁴C)-oléyl-Coenzyme A en acide *linoléique*. Cette observation est en bon accord avec les résultats *in vivo* et nous apprend que le système enzymatique concerné est inactif dans les tissus frais.

En isolant des microsomes à partir de tranches maintenues pendant des temps variables de survie, et en mesurant leur activité désaturasique,

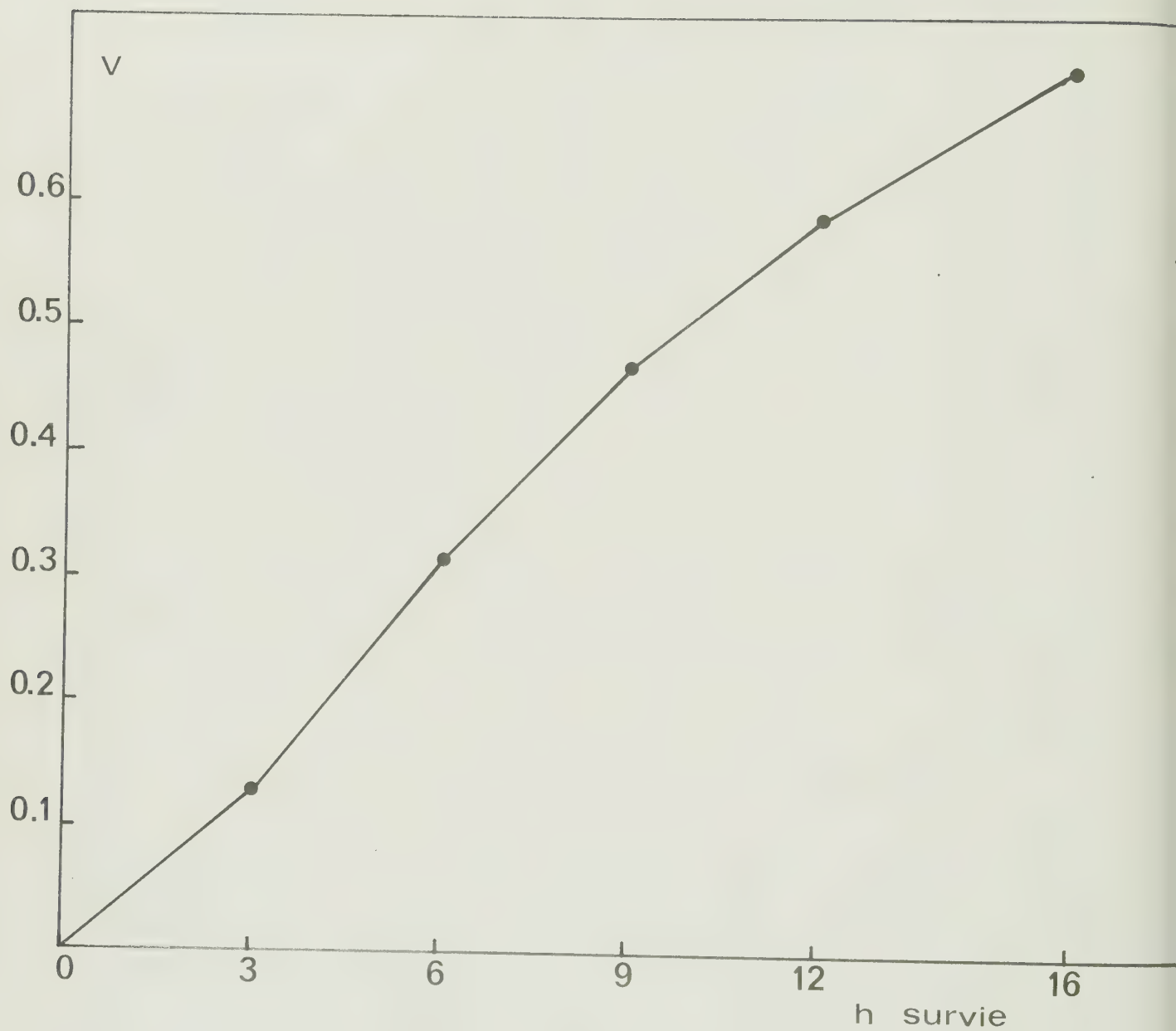


Fig. 47

Développement de l'activité de l'oleyl-coenzyme A désaturase au cours de la survie

La vitesse de la réaction (V) est exprimée en nanomoles d'acide linoléique synthétisé par heure et pour un culot microsomal isolé de 10 g de matière fraîche initiale.

Le temps de survie est indiqué en heures.

on trouve que cette activité augmente régulièrement au cours de la survie pour atteindre des valeurs élevées (plus de 40% après 16 heures de survie). Si l'on réalise la survie au froid, on diminue fortement cette induction de l'activité enzymatique (Fig. 43). L'allure des courbes est pratiquement identique aux graphiques obtenus *in vivo*.

c) Discussions.

Grâce à cette série d'expériences, nous avons pu mettre en évidence *in vitro* la désaturation de l'oléyl-Coenzyme A en acide *linoléique*. Excepté ces données, nouvelles dans le cas du tubercule de Pomme de terre, il n'existe que les travaux de Mc MAHON et STUMPF (1964), et VIJAY et STUMPF (1971) qui ont mis en évidence la même activité désaturasique dans les microsomes isolés de grain de Carthame en maturation 14 à 18 jours après la floraison. Il convient de signaler cette exigence primordiale quant au stade physiologique pour les synthèses.

Les résultats obtenus sur le tubercule de Pomme de terre n'ont pu l'être qu'en respectant des conditions satisfaisantes *in vivo* et *in vitro* ; dans la première exigence *in vivo*, il est indispensable de se placer dans les tissus en survie pour obtenir des désaturations. Le traitement de survie permet donc d'induire une intense activité désaturasique. Ceci constitue un grand attrait supplémentaire du phénomène étudié. La deuxième exigence est de respecter le plus possible *in vitro* l'activité enzymatique des microsomes isolés ; l'utilisation de sérum albumine à forte concentration a permis de satisfaire cette exigence et ceci constitue un avantage crucial pour les expériences ultérieures d'analyse des enzymes.

Les caractéristiques enzymatiques observées sur les microsomes isolés sont en bon accord avec les données de VIJAY et STUMPF (1972) sur l'oléyl-Coenzyme A désaturase de Carthame ou de celles de BAKER et LYNEN (1971) sur la même enzyme des microsomes isolés de *Neurospora crassa* ; ou encore les indications de HARRIS et al. (1967) sur un homogénat acellulaire de *Chlorella vulgaris*. Les deux exigences principales, d'une part l'oxygène, d'autre part un nucléotide réduit, ont été trouvées pour la première fois par BLOOMFIELD et BLOCH (1960) à propos de la désaturation du stéaryl-Coenzyme A en oléyl-Coenzyme A chez la levure. Le fait que dans nos expériences le NADH peut être remplacé par le NAD^+ signifie probablement que dans les micro-

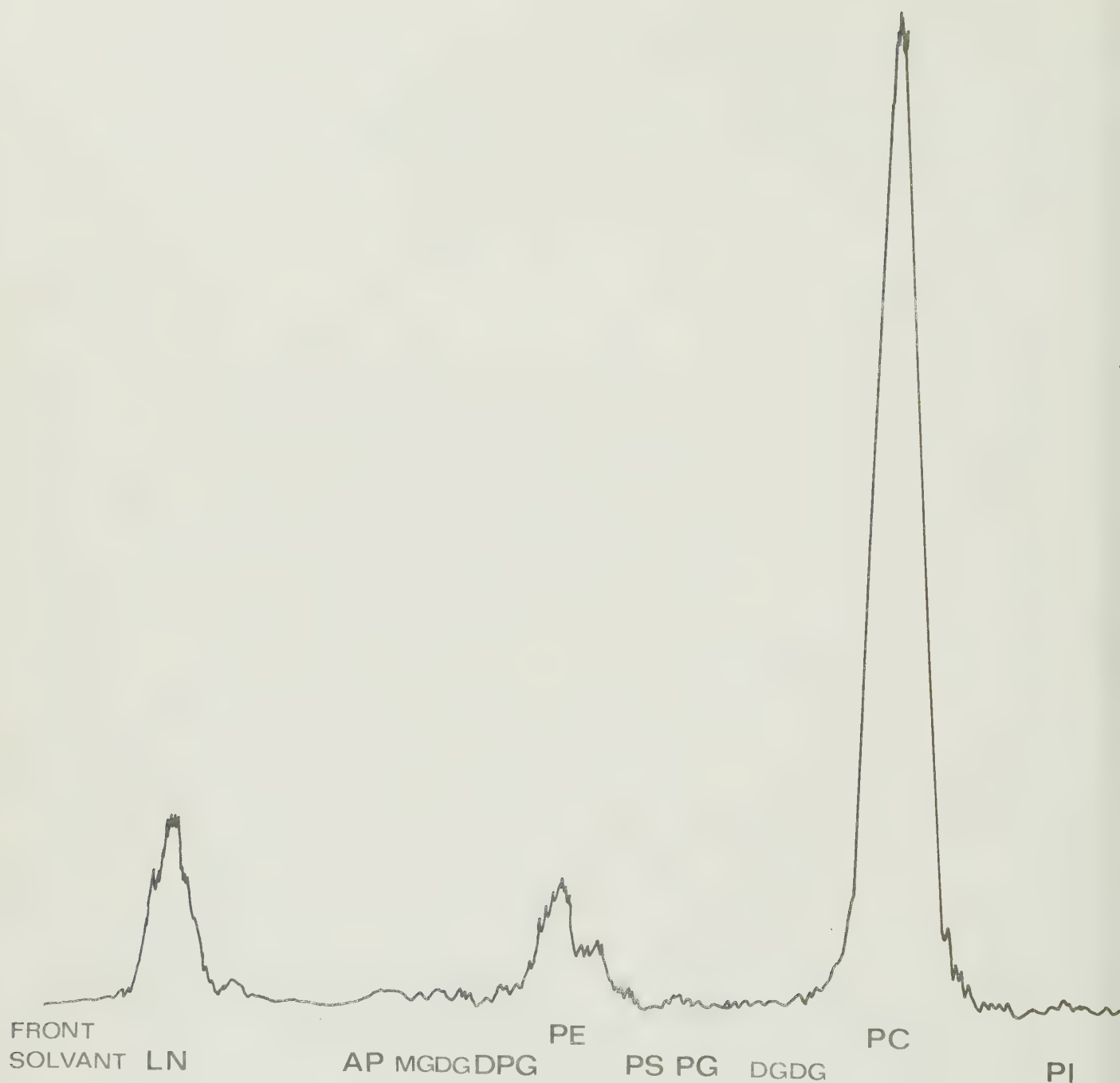


Fig. 48

Insertion des molécules d'oléyl-coenzyme A marqué, in_vitro, dans les catégories lipidiques des microsomes isolés de tranches en survie.

A la fin de l'incubation, les microsomes sont centrifugés à nouveau ; les lipides totaux sont ensuite extraits et chromatographiés sur couche mince selon la technique de Nichols (1964). Les plaques sont directement analysées par le système de détection de radioactivité Panax.

somes isolés de nos tissus, un système régénérant le NADH à partir de NAD^+ fonctionne ; ce système semble moins efficace lorsque du NADP^+ est fourni, puisque seul le NADPH permet une désaturation convenable. Les bonnes conditions d'incubation des microsomes isolés (et en particulier la sérum albumine de Boeuf) interviennent certainement dans le maintien de ce système régénérateur de nucléotides réduits ; la nécessité absolue de l'addition de NAD réduit, dans les expériences de VIJAY et STUMPF (1972), tient vraisemblablement en la fragilité des microsomes isolés dans leurs conditions. Par contre BAKER et LYNEN (1971) signalent que le NADP^+ est aussi efficace que le NADPH pour la désaturation de l'oléyl-Coenzyme A par les microsomes isolés de *Neurospora crassa* ; un système de régénération de NADPH existerait donc dans ces microsomes, qui seraient probablement moins fragiles et garderaient leur activité désaturasique au moins pendant une heure.

Comme le montre la figure 48, les molécules d'oléyl-Coenzyme A s'insèrent préférentiellement *in vitro* dans les molécules de phosphatidylcholine des microsomes. Dans la phosphatidylcholine, la désaturation est très élevée.

C - CONCLUSIONS GENERALES SUR LA BIOSYNTHESE DES LIPIDES AU COURS DE LA SURVIE.

Les résultats *in vitro* ont donc permis d'établir l'importante activité biosynthétique des microsomes ; cette fraction cellulaire contient, en particulier, les systèmes enzymatiques de désaturation qui permettent à partir de l'oléyl-Coenzyme A d'obtenir l'acide *linoléique*. Ces résultats ont été obtenus dans ces microsomes à la fois en étudiant l'incorporation de l'acétyl-Coenzyme A dans les acides gras totaux et en suivant la désaturation d'(1- ^{14}C)-oléyl-Coenzyme A. Les premières observations aléatoires et parfois non reproductibles sont devenues très sûres lorsque nous avons respecté deux précautions méthodologiques.

- l'une consiste à enrichir en magnésium le milieu de broyage, ce qui renforce la cohésion des membranes isolées.
- l'autre, essentielle, enrichit le milieu d'incubation en sérum albumine de Boeuf.

Ces deux précautions ont permis de stabiliser fortement l'activité

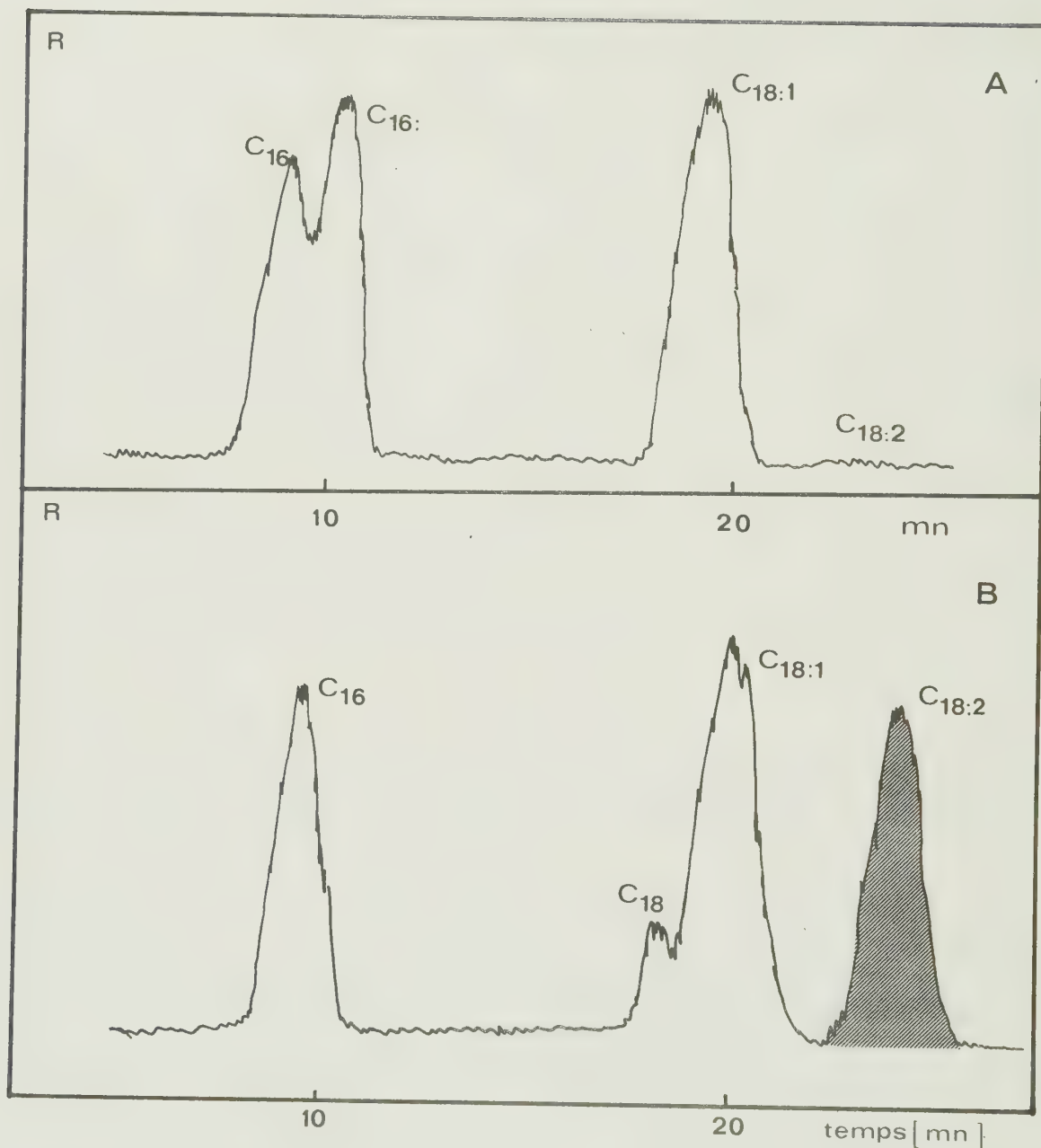


Fig. 49

Comparaison des capacités de biosynthèse des acides gras *in vitro* (A) et *in vivo* (B) par les mitochondries de tranches en survie (à partir d'acétate marqué comme précurseur).

enzymatique et des observations que nous venons de faire, indiquent que cette activité résiste à la congélation et à la décongélation (le pourcentage de désaturation est inchangé) (*Tableau XXII*) et supporte de fortes ultrasonifications (on obtient seulement une faible diminution de l'activité). Ces premiers résultats autorisent des espoirs raisonnables concernant une étude sérieuse des protéines impliquées dans cette activité désaturasique.

La survie joue un rôle essentiel dans ces expériences, puisqu'elle est indispensable à l'induction de l'activité de l'oléyl-Coenzyme A désaturase, inactive dans les tranches fraîches.

Les observations *in vitro* rejoignent d'une façon remarquable les observations *in vivo* ; c'est à dire respectivement :

- le développement important des membranes du réticulum endoplasmique (qui donnent les fragments microsomaux lors du fractionnement cellulaire) au cours de la survie, accompagnant l'apparition de la capacité de synthèse de l'acide *linoléique*
- l'incorporation importante du précurseur dans les lipides et les acides gras des microsomes, toujours observée le plus rapidement;
- la biosynthèse nulle de l'acide *linoléique in vivo* dans les microsomes de tissu frais, la biosynthèse active dans les microsomes de tissu en survie et d'autre part la désaturation *in vivo* de l'oléate d'ammonium, seulement active après survie.

Le fait que l'activité désaturasique *in vitro* reflète fidèlement l'activité appréciée *in vivo* renforce l'intérêt physiologique des expériences effectuées sur ces fractions isolées.

L'attribution des fonctions biosynthétiques importantes aux microsomes - phospholipides et acides gras - rejoint logiquement les données obtenues par d'autres auteurs sur les microsomes isolés de tissus végétaux et animaux (MORRÉ et al., 1970), (DEVOR et MUDD, 1971a), (BRENNER et PELUFFO, 1969).

Par contre la biosynthèse limitée des mitochondries isolées *in vitro* contraste fortement avec les données obtenues *in vivo* : les expériences *in vivo* avaient montré l'insertion active de molécules lipidiques nouvellement synthétisées dans les mitochondries laissées en place dans la cellule (*Fig. 49*). Une confirmation supplémentaire est l'activité oléyl-Coenzyme A désaturasique nulle dans les fractions mitochondriales isolées de tissu en survie.

Le désir d'expliquer cette apparente contradiction nous a conduit à rechercher si des échanges de lipides pouvaient se produire entre les microsomes et les mitochondries dans les tissus en survie.

V - ECHANGES DE LIPIDES ENTRE
FRACTIONS CELLULAIRES

Après une série d'expériences conduites sur le parenchyme de Pomme, nous avons pensé à une coopération entre les mitochondries et le reste de la cellule pour expliquer les différences observées en comparant le marquage des lipides dans les mitochondries maintenues *in vivo* ou mises en incubation *in vitro* (MAZLIAK et al., 1968). A peu près à la même époque, DAWSON (1966) avait imaginé une possibilité d'échanges de lipides à l'intérieur de la cellule animale, échanges entre microsomes et mitochondries. Il pouvait paraître audacieux d'imaginer des échanges de molécules phospholipidiques complètes entre les membranes intracellulaires, mais il est cependant connu que ces membranes sont perméables à des molécules dont le poids moléculaire peut aller jusqu'à 600 (MAZLIAK, 1971).

D'autre part, dans l'organisme animal, il est bien connu que certains échanges de phospholipides essentiels existent : échanges de phospholipides entre plasma et globules rouges (MINARI et ZILVERSMIT, 1963), échanges de phospholipides entre lipoprotéines du plasma (MARGOLIS, 1969), échanges de phospholipides entre lipoprotéines et chylomicrons (MINARI et ZILVERSMIT, 1963). Ces échanges intercellulaires jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie biochimique de l'animal.

Plus récemment, des échanges de lipides entre organites intracellulaires du foie de Rat furent mis en évidence. Les premiers chercheurs à réaliser des expériences montrant directement ces échanges phospholipidiques furent KADENBACH (1968a), WIRTZ et ZILVERSMIT (1968), McMURRAY et DAWSON (1969), AKIYAMA et SAKAGAMI (1969).

Le principe de ces expériences est toujours le même : on injecte au Rat du phosphate de sodium marqué au ^{32}P puis, après un certain temps, on retire les microsomes marqués du foie de l'animal. On réalise ensuite des mélanges d'organites cellulaires marqués et non marqués ; après un certain temps de contact, les organites sont séparés et les radioactivités spécifiques des phospholipides sont mesurées.

A peu près à la même époque, nous avons commencé nos expériences d'échanges entre les différents organites du tubercule de Pomme de terre (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1969 ; BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1970).

A - ECHANGES DE LIPIDES IN VITRO ENTRE FRACTIONS CELLULAIRES ISOLEES DE
=====

TISSU FRAICHEMENT PRELEVE.
=====

Nous nous sommes intéressés tout d'abord aux échanges de phospho-
lipides entre les fractions cellulaires isolées de tranches de tubercule
fraîchement coupées.

1) Echanges de phospholipides.

a) Mélanges expérimentaux.

a₁ - Fractions cellulaires non marquées.

Les fractions cellulaires non marquées sont isolées de 500 g de
parenchyme central de tubercule. Les mitochondries et les microsomes bruts
sont purifiés sur gradient de saccharose, comme décrit plus haut ; les culots
sont remis en suspension dans 3 ml de "surnageant concentré" qui est obtenu
comme suit : on traite 150 g de tissu non pas en présence de 150 ml, mais
en présence de 35 ml de solution de broyage. Le broyat est directement cen-
trifugé à 100.000 g pendant 1 heure.

a₂ - Préparation des fractions cellulaires marquées.

On part de 200 g de tranches de tissu, placées dans 200 ml d'une
solution de sulfate de calcium (10^{-4} M) et d'un précurseur radioactif : ($1-^{14}\text{C}$)-
acétate de sodium (10 $\mu\text{Ci/ml}$), (^{32}P)-phosphate de sodium (10 $\mu\text{Ci/ml}$) ou
($1-^{14}\text{C}$)-glycérol (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$). Après 3 ou 12 heures d'incubation à 25°C, en
constante agitation, on rince abondamment à l'eau et on isole les fractions
cellulaires exactement de la même façon que les fractions non marquées ;
les mitochondries et les microsomes sont purifiés sur gradient de saccharose.
En outre, on conserve le surnageant des microsomes ; ce surnageant, contenant
des lipides marqués, sera utilisé par la suite.

a₃ - Mélanges expérimentaux d'organites.

Mitochondries marquées et microsomes non marqués.

On introduit dans une fiole de Warburg 0,5 ml de suspension mitochondriale marquée (400 à 500 µg de phospholipides) et 0,5 ml de suspension microsomale non marquée (800 à 1000 µg de phospholipides). Après un temps d'incubation variable (entre 15 et 120 mn) à 25°C, en constante agitation, on place la fiole dans de la glace pendant 30 minutes. Le contenu de la fiole est déposé sur gradient de densité de saccharose, identique à celui préparé pour purifier les fractions avant les mélanges. Après centrifugation à 30.000 g pendant 1 heure, on recueille les bandes correspondant aux mitochondries et aux microsomes, on ajoute de la solution de saccharose 0,4 M pour ajuster la molarité, puis on centrifuge de nouveau à 10.000 g pendant 20 minutes pour obtenir les mitochondries et à 100.000 g pendant 1 heure pour recueillir les microsomes. On extrait ensuite les lipides des culots d'organites et du surnageant des microsomes.

Microsomes marqués et mitochondries non marquées.

On mélange 0,5 ml de mitochondries non marquées (450 à 500 µg de phospholipides) et 0,5 ml de microsomes marqués (450 à 750 µg de phospholipides). L'expérience se déroule comme dans le paragraphe précédent.

Surnageant cytoplasmique marqué et fractions non marquées.

Dans une fiole, on introduit 10 ml de surnageant cytoplasmique marqué (400 µg de phospholipides) et 0,5 ml de microsomes non marqués (350 µg de phospholipides) ou 0,5 ml de mitochondries non marquées (400 µg de phospholipides). Après 60 ou 120 minutes d'incubation, on centrifuge directement à 10.000 g pendant 20 minutes (pour les mitochondries) ou à 100.000 g pendant 1 heure (pour les microsomes). On extrait ensuite les lipides des culots et des surnageants.

b) Résultats.

b₁ - Distribution des lipides radioactifs au cours des incubations.

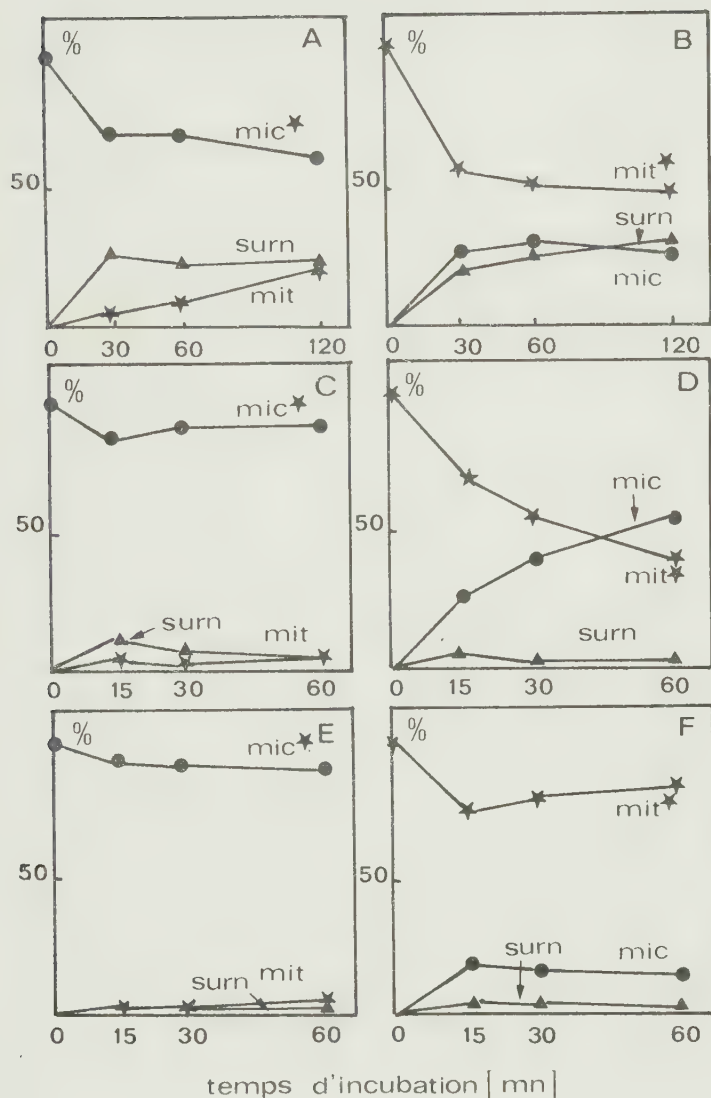


Fig. 50

Echanges de lipides marqués entre fractions cellulaires de tubercule de pomme de terre.

On a mélangé des microsomes marqués (mic*) avec des mitochondries (mit) en présence de surnageant (surn) (A, C, E), ou des mitochondries marquées (mit*) avec des microsomes non marqués (mic) (B, D, F).

Les lipides sont marqués soit par le (1-¹⁴C)-acétate (A et B), soit par le (32P)-phosphate de sodium, (C et D), soit par le (1-¹⁴C)-glycérol (E et F).

La répartition de la radioactivité, à la fin de l'incubation, parmi les différentes fractions est indiquée en %.

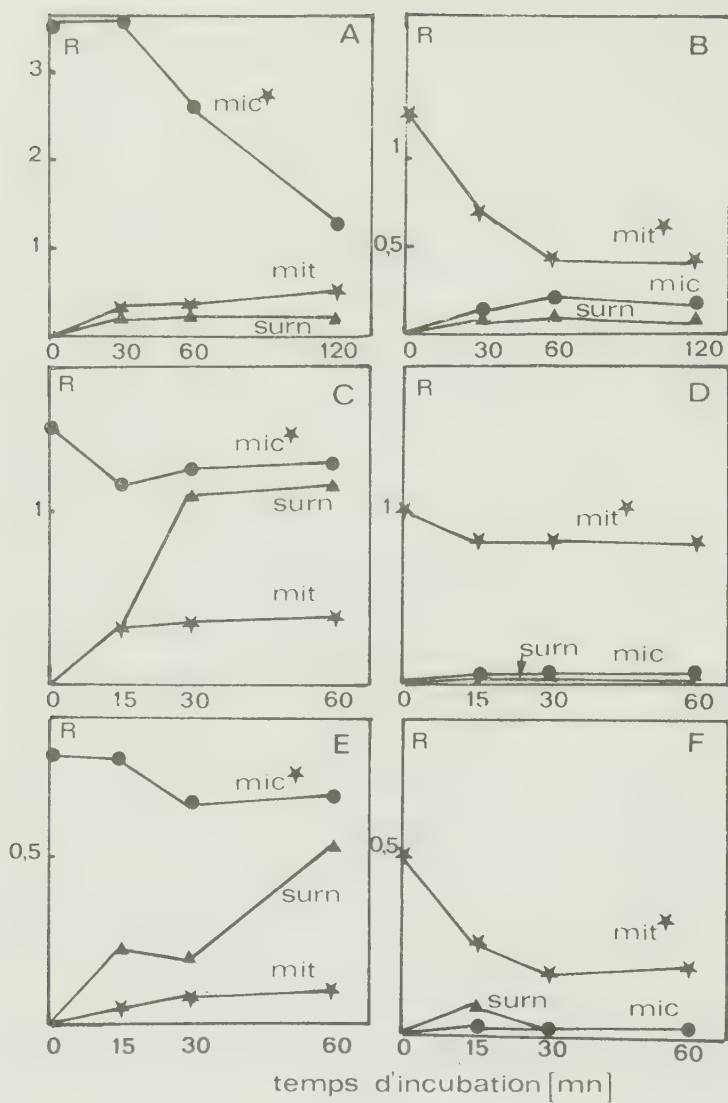


Fig. 51

Echanges de lipides marqués entre fractions cellulaires de tubercule de pomme de terre.

Les abréviations de A à D sont expliquées dans la figure 50.
R représente la radioactivité spécifique des phospholipides, exprimée en 10^{-6} cpm par mg de phospholipide.

Microsomes marqués et mitochondries non marquées

Lorsque des microsomes contenant des phospholipides marqués par le $(1-^{14}\text{C})$ -acétate sont mis en présence de mitochondries non radioactives, on constate (*Fig. 50*) qu'une partie de la radioactivité initialement présente dans les microsomes se retrouve dans les mitochondries et le surnageant cytoplasmique. La radioactivité des lipides microsomaux diminue régulièrement tout au long de l'expérience ; l'activité résiduelle dans cette fraction après 120 mn n'est plus que 60% de la radioactivité initiale. Le même transfert de radioactivité s'observe quand le (^{32}P) -phosphate de sodium ou le $(1-^{14}\text{C})$ -glycérol ont servi de précurseur de phospholipides ; près de 90% de la radioactivité initiale se retrouve encore dans la fraction microsomale après deux heures d'incubation, ce qui signifie que le transfert de lipides est moins intense dans les deux derniers cas alors qu'il est plus actif quand les lipides sont marqués à partir du $(1-^{14}\text{C})$ -acétate.

Mitochondries marquées et microsomes non marqués.

On peut observer que la radioactivité des lipides de la fraction mitochondriale "donneur" diminue régulièrement pendant l'incubation, quel que soit le précurseur utilisé (environ 40% de la radioactivité initiale de la fraction mitochondriale après 1 heure d'expérience). Une partie importante de la radioactivité perdue se retrouve dans la fraction microsomale (plus de 50% dans le cas du (^{32}P) -phosphate).

Ces résultats montrent que les fractions cellulaires donneurs cèdent les lipides marqués qui passent dans les organites receveurs. Ce passage intéresse également le surnageant cytoplasmique qui contient aussi des lipides marqués

b₂ - Evolution des radioactivités spécifiques des phospholipides des organites mis en incubation.

Microsomes marqués et mitochondries non marquées.

La figure 51 montre que la radioactivité spécifique des phospholipides des microsomes marqués par le $(1-^{14}\text{C})$ -acétate diminue régulièrement quand on mélange ces microsomes avec des mitochondries non marquées. Il y a apparition d'une certaine quantité de radioactivité dans les phospholipides des mitochondries et dans ceux dispersés dans le surnageant cytoplasmique. Lorsque les lipides sont marqués par le (^{32}P) -phosphate ou le $(1-^{14}\text{C})$ -glycérol,

on observe les mêmes phénomènes avec, cependant, une diminution moins nette de la radioactivité spécifique des microsomes et une radioactivité spécifique plus élevée des lipides du surnageant.

Mitochondries marquées et microsomes non marqués.

Dans le sens réciproque, la radioactivité des phospholipides des mitochondries marquées subit une diminution importante ; il y a apparition d'une certaine quantité de radioactivité dans les microsomes et le surnageant, importante surtout avec l'acétate comme précurseur ; la radioactivité spécifique des phospholipides des fractions cellulaires initialement non marquées augmente régulièrement pendant la première heure d'expérience.

Dans ces deux séries d'expériences, la diminution de la radioactivité spécifique des phospholipides des fractions "donneurs" peut s'interpréter comme due à un départ de lipides marqués, compensé par une arrivée de lipides non marqués venant de l'autre fraction. On met ainsi en évidence deux courants d'échanges de phospholipides : des mitochondries vers les microsomes et, réciproquement, des microsomes vers les mitochondries.

b₃ - Evaluation des quantités de phospholipides échangées entre les fractions

On peut apprécier la quantité P_t des phospholipides radioactifs arrivés au temps t , sur une fraction cellulaire initialement non marquée, en divisant la radioactivité totale T_t des phospholipides de cette fraction au temps t , par la radioactivité spécifique initiale S_0 des phospholipides de la fraction marquée au départ :

$$P_t = \frac{T_t}{S_0}$$

La quantité de phospholipides supplémentaires arrivée au temps $t + 1$ dans la fraction receveur est obtenue en divisant la différence des radioactivités totale $T_{t+1} - T_t$ par la radioactivité spécifique S_t au temps t des phospholipides de la fraction donneur. Donc la quantité de phospholipides P_{t+1} transférés sur la fraction "receveur" au temps $t + 1$ est donnée par l'expression :

$$P_{t+1} = P_t + \frac{T_{t+1} - T_t}{S_t}$$

En outre, pour tenir compte des pertes de phospholipides qui se

produisent au cours des différentes centrifugations et des passages sur gradient, on ne prend en considération que la radioactivité spécifique déterminée expérimentalement et on calcule les radioactivités totales en multipliant les radioactivités spécifiques déterminées aux deux temps par les quantités des phospholipides mesurées dans chaque fraction au temps initial.

Les résultats obtenus (*Fig. 52*) avec les 3 précurseurs différents et dans les deux types de mélanges d'organites (mitochondries marquées et microsomes non radioactifs ou, réciproquement, mitochondries non marquées et microsomes radioactifs) sont du même ordre de grandeur : 100 à 200 μg de phospholipides arrivent en 1 heure sur la fraction receveur. Les échanges paraissent plus actifs quand ils sont suivis avec l'acétate marqué ; ils paraissent plus faibles avec le (^{32}P)-phosphate ou le ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-glycérol ; les échanges sont plus actifs dans le sens microsomes vers mitochondries (ceci n'est cependant pas vrai dans le cas des marquages par le glycérol). La cinétique d'échange semble plus linéaire dans le sens microsomes vers mitochondries, au moins avec l'acétate comme précurseur. Avec le (^{32}P)-phosphate et le ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-glycérol, les échanges ont tendance à se ralentir après la première demi-heure d'expérience.

On procède de la même façon que précédemment pour apprécier la quantité de chaque phospholipide échangé. On constate que les phospholipides les plus importants en masse, c'est à dire la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, sont aussi ceux qui fournissent des quantités majeures de phospholipides échangées entre les fractions et ce, quel que soit le précurseur utilisé (*Fig. 53*) ; les quantités de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine échangées sont plus grandes avec l'acétate comme précurseur. Les autres phospholipides - phosphatidylsérine, diphosphatidylglycérol - semblent plus faiblement échangés ; mais il convient de signaler les difficultés expérimentales liées à l'appréciation des quantités de phospholipides mineurs ; on peut donc seulement retenir le fait que ces constituants ne forment pas une part très importante des phospholipides échangés.

D'autres données intéressantes sont obtenues en calculant les pourcentages de la quantité des phospholipides arrivée sur la fraction "receveur" par rapport à la quantité de ces phospholipides contenue initialement dans cette fraction. On peut évaluer ainsi l'importance du remplacement des phospholipides non marqués par des molécules marquées au cours des échanges ; ces pourcentages ne sont pas plus élevés pour la phosphatidylcholine et la phos-

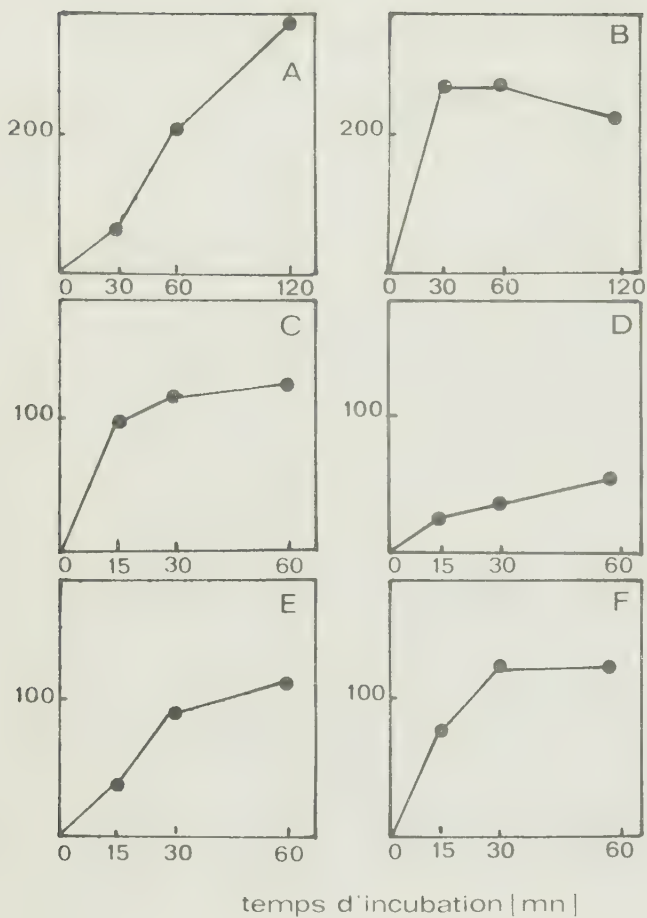


Fig. 52

Echanges de lipides marqués entre fractions cellulaires de tubercule de pomme de terre.

Les quantités de phospholipides échangées sont exprimées en µg. Les abréviations de A à D sont expliquées dans la figure 50.

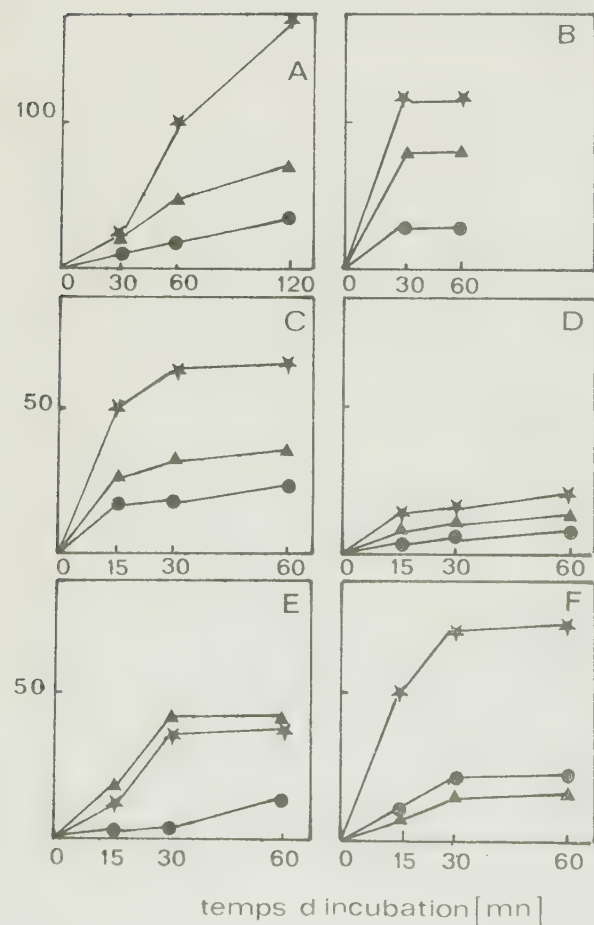


Fig. 53

Echanges de lipides marqués entre fractions cellulaires de tubercule de pomme de terre.

En ordonnée sont portées les quantités en µg des phospholipides arrivés sur les fractions initialement non marquées. Seuls ont été indiqués les principaux phospholipides : ★ = PC, ▲ = PE, ● = PI.

Les abréviations de A à D sont expliquées dans la figure 50.

phatidyléthanolamine que pour les autres phospholipides : en 30 mn, en moyenne, 20 à 25% des molécules sont remplacées par des molécules marquées. Pour une série d'expériences donnée, on peut noter une bonne homogénéité dans les pourcentages de remplacement observés pour les différents phospholipides majeurs, quels que soient les précurseurs radioactifs utilisés. Les pourcentages de phospholipides remplacés sur les fractions cellulaires du tubercule de Pomme de terre sont du même ordre de grandeur que ceux observés sur les fractions animales au cours d'expériences similaires (WIRTZ et ZILVERSMIT, 1968 ; McMURRAY et DAWSON, 1969 ; WIRTZ et al., 1970).

b₄ - Echanges entre le surnageant cytoplasmique et les fractions cellulaires.

Dans une série supplémentaire d'expériences, nous avons mélangé à du surnageant cytoplasmique contenant des lipides marqués des organites non radioactifs. Comme l'indique le tableau XXXV, la radioactivité totale des lipides du surnageant cytoplasmique marqué à l'acétate, au (³²P)-phosphate de sodium ou au (1-¹⁴C)-glycérol diminue après 30 minutes d'incubation. Une partie de la radioactivité totale se retrouve dans les organites. De même la radioactivité spécifique des lipides diminue après l'incubation.

Ces faits montrent que des échanges *in vitro* existent entre les lipides (notamment les phospholipides) dispersés dans le surnageant cytoplasmique et ceux présents dans les organites cellulaires (microsomes et mitochondries).

c) Discussions.

La purification systématique des organites sur gradient de densité de saccharose avant et après mélange des fractions isolées nous permet d'écarter l'éventualité d'une importante contamination d'une fraction cellulaire par une autre. Les déterminations des activités enzymatiques et les contrôles en microscopie électronique renforcent cette affirmation. D'autre part, nous avons étudié une fiole témoin - constituée uniquement d'un certain volume de suspension microsomale marquée et d'un volume de solution de lavage - qui est laissée 60 mn en incubation ; le contenu de cette fiole est ensuite déposé sur gradient de saccharose comme il a été décrit plus haut ; en

TABLEAU XXXV

Echanges de lipides entre le surnageant cytoplasmique, les mitochondries ou les microsomes de Pomme de terre.

10 ml de surnageant cytoplasmique marqué sont mélangés à 0,5 ml d'une suspension d'organites non marqués. L'incubation se poursuit en constante agitation.

Fraction cellulaire non marquée	Précurseur	Temps d'incubation (mn)	Radioactivités					
			Totales			Spécifiques		
			Surn	Mit	Mic	Surn	Mit	Mic
				(cpm)		cpm.mg ⁻¹	phosphol.	
Mitochondries	(1- ¹⁴ C)-acétate	0	700	0	0	604	0	0
Mitochondries	" "	120	323	282		71	24	
Microsomes	(1- ¹⁴ C)-acétate	0	700	0	0	604	0	0
Microsomes	" "	120	442		144	250		132
Mitochondries	(³² P)-phosphate	0	74	0		1.300	0	0
Mitochondries	" "	60	29	20		1.200	65	
Microsomes	(³² P)-phosphate	0	74	0		1.300	0	0
Microsomes	" "	60	22		25	911		41
Mitochondries	(1- ¹⁴ C)glycérol	0	28	0		507	0	
Mitochondries	" "	60	17	7		430	16	
Microsomes	(1- ¹⁴ C)glycérol	0	28	0		507	0	
Microsomes	" "	60	17		12	289		8

Surn = surnageant cytoplasmique ; Mit = mitochondries ; Mic = microsomes

recueillant la couche de saccharose où se rassemblent en théorie les mitochondries (dans ces expériences de mélange de fractions), on trouve une radioactivité pratiquement nulle (0,05% de la radioactivité initiale des microsomes) alors que dans la plupart des expériences, on retrouve 15 à 20% de la radioactivité initiale.

La possibilité d'échanges *in vitro* de lipides (notamment de phospholipides) entre diverses fractions cellulaires d'un même tissu animal a été démontrée par KADENBACH (1968a), WIRTZ et ZILVERSMIT (1968), McMURRAY et DAWSON (1969), AKIYAMA et SAKAGAMI (1969), SAUNER et LEVY (1971), WOJTCZAK et al. (1971), BLOK et al. (1971), toujours sur le foie de Rat.

Nos résultats sont les premiers concernant les échanges de phospholipides entre fractions cellulaires isolées de tissus végétaux. En travaillant sur les inflorescences de Chou-fleur, nous avons trouvé des échanges similaires de phospholipides entre les fractions isolées de ce tissu (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1970). La similitude des cinétiques d'échange dans les deux espèces végétales étudiées suggère que les phénomènes mis en évidence ont sans doute une valeur générale. Cette idée se trouve renforcée par la comparaison des résultats obtenus sur les fractions cellulaires animales ou végétales ; dans tous les cas, les flux d'échange observés sont comparables, les phospholipides qui voyagent en plus grandes quantités sont les mêmes, le rôle du surnageant cytoplasmique est toujours important.

Le fait que les résultats obtenus avec les trois précurseurs différents sont très comparables nous fait penser qu'il s'agit d'un véritable échange de molécules phospholipidiques entières et non d'un échange de certaines parties de molécules seulement ; cependant, en évaluant les quantités totales des phospholipides échangées arrivant sur la fraction receveur, on s'aperçoit que les quantités échangées sont nettement plus grandes quand on utilise le (1-¹⁴C)-acétate comme précurseur ; nous pensons donc qu'en plus d'un échange brut de phospholipides entre les fractions, il se produit un échange d'acides gras libérés des phospholipides sous l'action de phospholipases.

Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en étudiant directement les échanges de molécules d'acides gras entre les fractions cellulaires isolées de tranches de tubercules fraîches.

TABLEAU XXXVI

Echanges in vitro d'acides gras marqués entre microsomes et mitochondries de tubercule de Pomme de terre.

Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

Les mitochondries (Mit⁺) contenant des acides gras marqués sont mélangées aux microsomes (Mic).

	% de la radioactivité totale des acides gras d'une même fraction cellulaire			
temps acides gras	0 mn		30 mn	
	Mit ⁺	Mic	Mit ⁺	Mic
C ₁₆	12,3	—	11,4	17,6
C ₁₈	13,2	—	14,5	14,5
C _{18:1}	64,5	—	67,0	63,2
C _{18:2}	10,0	—	7,1	4,7
	60 mn		120 mn	
C ₁₆	10,8	16	20	15,7
C ₁₈	15,5	19,6	6,6	9,9
C _{18:1}	66,0	60,0	66,0	69,0
C _{18:2}	7,5	4,4	7,4	5,4

2) Echanges d'acides gras.

a) Techniques expérimentales.

Les techniques utilisées sont identiques à celles mises en oeuvre pour l'étude de l'échange des phospholipides (MAZLIAK et BEN ABDELKADER, 1971).

Le précurseur utilisé pour marquer les fractions cellulaires est, dans ces expériences, exclusivement le (1- ^{14}C)-acétate de sodium qui est activement incorporé dans les acides gras. Après extraction des lipides totaux, on procède à l'extraction et à la méthylation des acides gras ; après mesure de la radioactivité totale de la solution, une analyse par radiochromatographie en phase gazeuse nous permet de savoir quels sont les acides gras radioactifs et quelle est leur radioactivité spécifique.

b) Résultats.

b₁ - Echanges d'acides entre mitochondries et microsomes.

Lorsque des mitochondries contenant des acides gras marqués au ^{14}C sont mélangées pendant 30 ou 60 minutes à des microsomes non radioactifs, dans un petit volume de surnageant cytoplasmique, on constate, après séparation des organites, que des acides gras radioactifs sont apparus dans les microsomes initialement non marqués. La répartition de la radioactivité apparue entre les acides gras des microsomes est tout à fait parallèle à celle existant dans les microsomes initialement marqués, que les incubations aient duré 30, 60 ou 120 minutes (Tableau XXXVI). On peut en conclure 1) que toutes les catégories d'acides gras marquées ont été transférées des mitochondries aux microsomes et 2) que les acides gras sont transférés proportionnellement à leur importance quantitative. Ainsi les acides gras contenant le plus de radioactivité dans la fraction donneur sont aussi ceux qui présentent les plus forts pourcentages de la radioactivité totale dans les fractions receveurs.

L'expérience prouve aussi que le transfert de la radioactivité ne résulte pas d'une dégradation des acides gras marqués en fragments à deux atomes de carbone, suivie d'une resynthèse ; dans cette hypothèse, la répartition de la radioactivité ne serait pas la même dans les fractions donneur

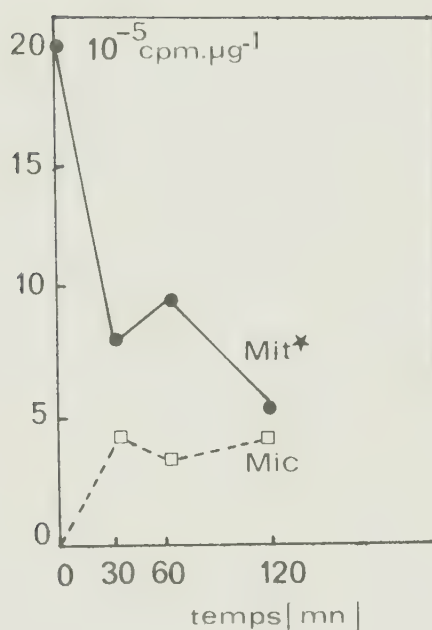


Fig. 54

Echanges d'acides gras in vitro entre mitochondries initialement marquées (Mit) et microsomes non marqués. On a indiqué en ordonnée la radioactivité spécifique de l'acide oléique (en cpm par microgramme d'acide gras).

et receveur. Nous avons vu d'autre part que la capacité de biosynthèse des acides gras par les fractions isolées est tout à fait différente de celle des tranches de tissu. Nous avons vérifié que la composition en acides gras des organites ne changeait pas de façon significative au cours des incubations.

Si l'on considère la variation des radioactivités spécifiques des acides gras au cours de ces expériences, on peut observer que les radioactivités diminuent dans la fraction donneur et augmentent dans la fraction receveur : on peut prendre comme exemple l'acide *oléique* (Fig. 54).

b₂ - Prélèvement d'acides gras dans le surnageant cytoplasmique.

Lorsque des mitochondries ou des microsomes de Pomme de terre sont mis en suspension pendant 120 minutes dans un volume de surnageant cytoplasmique contenant des acides gras marqués par le (1-¹⁴C)-acétate, on constate, après recentrifugation des organites, que des acides gras marqués se sont fixés sur les membranes. La distribution de la radioactivité entre les divers acides gras est la même dans le surnageant initialement marqué et dans les fractions cellulaires en fin d'expérience. L'acide *oléique* renferme le maximum de carbone radioactif dans le surnageant de départ, puis dans les mitochondries ou microsomes en fin d'expérience. Donc les acides gras marqués du surnageant ont été fixés sur les organites proportionnellement à leur quantité dans le surnageant. Inversement, les organites en suspension ont perdu des acides gras non marqués dans le milieu puisque les activités spécifiques de tous les acides gras du surnageant cytoplasmique ont beaucoup diminué après deux heures d'incubation.

Cette expérience confirme le fait que les échanges de lipides entre organites s'effectuent par l'intermédiaire du surnageant cytoplasmique, jouant le rôle d'accepteur transitoire des lipides qui s'échangent.

c) Discussions.

Les expériences que nous venons de décrire prouvent que les acides gras peuvent, *in vitro*, passer d'une fraction cellulaire à une autre sans être dégradés.

Des expériences conduites sur le tissu de Chou-fleur ont donné des résultats analogues.

Des échanges d'acides gras entre organites intracellulaires n'ont jamais été montrés directement dans d'autres tissus. Par contre, on connaît bien l'action des acides gras exogènes sur les phosphorylations oxydatives des mitochondries isolées ou sur certaines réactions enzymatiques se produisant dans les mitochondries ; cette action nécessite une absorption et une entrée de l'acide gras dans les membranes où la réaction enzymatique a lieu. L'action découplante des acides gras à longue chaîne a été observée plusieurs fois dans des mitochondries animales : (HULSMANN et al., 1960 ; WOJTCZAK et WOJTCZAK, 1960 ; WOJTCZAK et al., 1969) ; les acides gras provoquent aussi le gonflement des mitochondries (LEHNINGER, 1966), cet effet étant lié à l'action découplante et dépendant de la longueur de la chaîne hydrocarbonée et de son degré d'insaturation (AHMED et SHOLEFIELD, 1960).

Récemment, SAUNER et LEVY (1971), WOJTCZAK et al. (1971) ont montré que les membranes externes et internes mitochondriales pouvaient absorber des acides gras marqués exogènes : $(1-^{14}\text{C})$ -palmitique ou $(1-^{14}\text{C})$ -oléate. Signalons que BADDELEY et HANSON (1967) ont observé une absorption interne de $(1-^{14}\text{C})$ -linoléate dans les mitochondries de Blé. De récentes expériences ont montré que les mitochondries de Pomme de terre peuvent incorporer *in vitro* $1'(1-^{14}\text{C})$ -palmitate, $1'(1-^{14}\text{C})$ -oléate, $1'(1-^{14}\text{C})$ -stéarate, ainsi que $1'(1-^{14}\text{C})$ -oléyl-Coenzyme A.

Ces résultats sont en bon accord avec les échanges de molécules d'acides gras observés entre les organites de Pomme de terre ou de Chou-fleur.

Nous reviendrons par la suite sur l'importance de tels échanges d'acides gras et sur les mécanismes que l'on peut imaginer pour expliquer leur existence.

*B - ECHANGES DE LIPIDES IN VITRO ENTRE FRACTIONS CELLULAIRES ISOLEES DE
=====*
TISSU FRAIS ET DE TISSU EN SURVIE.
=====

Connaissant tous les bouleversements métaboliques entraînés par la survie, il était intéressant de suivre les échanges de lipides entre organites intracellulaires isolés de tranches de tubercules maintenues préalablement en survie. En outre, nous savons que la survie permet d'obtenir des

membranes contenant de l'acide *linoléique* marqué ; ceci va rendre possible l'étude de l'éventuel échange de cet acide gras important entre les membranes, ce qui était impossible à faire dans les tranches fraîches.

Dans un souci de simplification, nous avons étudié les échanges de lipides entre microsomes radioactifs et mitochondries non marquées isolées des différents tissus que nous allons examiner ; d'autre part, le précurseur utilisé dans ces expériences est l'(1-¹⁴C)-acétate, activement incorporé dans les phospholipides et les acides gras.

1) Mélanges expérimentaux.

a) Isolement des fractions.

a₁ - Obtention des microsomes marqués (Mic_S⁺).

La suspension microsomale marquée est obtenue à partir de 100 g de tranches de tubercules maintenues en survie pendant 24 heures. Le précurseur radioactif((1-¹⁴C)-acétate de sodium)est fourni aux tranches de tubercules pendant 6 premières heures de survie, puis le précurseur est éliminé par rinçage et les tranches de tissu sont remises en survie pendant les 18 heures suivantes. Comme nous l'avons déjà indiqué (paragraphe IV, A, 3, d₂), dans ces conditions, l'acide *linoléique* est fortement marqué.

Les microsomes, isolés selon les techniques déjà décrites et purifiés sur gradient de saccharose, sont remis en suspension dans 5 ml de "surnageant cytoplasmique concentré" isolé de tranches fraîches.

a₂ - Obtention des mitochondries non marquées isolées de tranches en survie (Mit_S).

Les mitochondries non marquées sont isolées de 300 g de tranches de tubercules préalablement maintenues en survie pendant 24 heures. Les techniques d'isolement et de purification sur gradient de saccharose sont exactement les mêmes que celles décrites auparavant. Les mitochondries (Mit_S) sont remises

TABLEAU XXXVII

Echanges de lipides entre fractions cellulaires isolées de tranches fraîches ou en survie prélevées dans des tubercules de Pomme de terre. Description des mélanges expérimentaux étudiés.

	Mit _S , f	Mit _S , s	Mit _F , s
Mic _S [*] , s	-	Mic _S [*] + s + Mit _S , s (30-60-90) mn	Mic _S [*] + s + Mit _F , s (30-60-90) mn
Mic _S [*] , f	Mic _S [*] + f + Mit _S , f	-	-
S [*]	-	Mit _S , s + S [*]	Mit _F , s + S [*]

Mic_S^{*} = Microsomes contenant des lipides marqués, isolés de tranches en survie

s = Surnageant cytoplasmique "concentré", isolé de tranches en survie

f = Surnageant cytoplasmique "concentré", isolé de tranches fraîches

Mit_S, f = Mitochondries isolées de tranches en survie et remises en suspension dans le surnageant cytoplasmique f

Mit_F, s = Mitochondries isolées de tranches fraîches et remises en suspension dans le surnageant cytoplasmique s

S^{*} = Surnageant cytoplasmique contenant des lipides radioactifs provenant de tranches de tissu en survie.

en suspension dans 3 ml de surnageant cytoplasmique concentré isolé de tranches en survie ou dans 1 ml de surnageant cytoplasmique concentré isolé de tranches fraîches.

a₃ - Mitochondries non marquées isolées de tranches fraîches (Mit_F)

A partir de 200 g de tranches fraîches, on isole et on purifie sur gradient les mitochondries qui sont remises en suspension dans 2 ml de surnageant cytoplasmique concentré isolé de tranches fraîches ou en survie.

a₄ - Obtention de surnageant cytoplasmique concentré (s ou f)

On broie 150 g de tranches fraîches ou la même quantité de tranches en survie (poids de matière fraîche initiale) depuis 24 heures, dans 35 ml de milieu de broyage classique. Une centrifugation à 10.000 g pendant 1 heure élimine les mitochondries et les microsomes. Les surnageants des centrifugations sont respectivement le surnageant cytoplasmique concentré isolé de tissus frais et le surnageant cytoplasmique concentré isolé de tissus en survie.

b) Mélanges expérimentaux

Dans le tableau XXXVII, nous présentons les différents mélanges expérimentaux réalisés :

b₁ - Mélange de microsomes marqués, isolés de tissus en survie , et de mitochondries non marquées , provenant de tissus en survie.

On mélange 0,5 ml de microsomes marqués(Mic_S⁺) à 0,5 ml de mitochondries non marquées , isolées de tissus en survie et remises en suspension dans le surnageant de tissus en survie (Mit_{S,s}) ou à 0,5 ml de mitochondries isolées de tissus en survie et remises en suspension dans le surnageant de tissus frais (Mit_{S,f}), en présence , respectivement, de 1 ml de surnageant de tissus en survie (s) ou de 1 ml de surnageant cytoplasmique de tissus frais(f).

TABLEAU XXXVIII

Radioactivités spécifiques des phospholipides des fractions cellulaires mélangées selon les conditions expérimentales expliquées dans le tableau XXXVII (en cpm.mg phospholipides⁻¹).

On a indiqué ici les résultats d'une expérience, typiques de ceux obtenus dans trois expériences différentes.

cpm.mg phospholipides⁻¹

Temps (en mn)	0	30	60	90
Mic _S [*]	3.540	2.520	2.430	2.160
Mit _S , s	0	605	700	788
Mic _S [*]	3.540	2.350	2.300	2.290
Mit _S , f	0	551	609	715
Mic _S [*]	3.540	2.520	2.350	2.380
Mit _F , s	0	441	462	534
S [*]	5.500	—	—	860
Mit _S , s	0	—	—	320
S [*]	5.500	—	—	1.250
Mit _F , s	0	—	—	272

Le temps de contact est de 30, 60 ou 90 minutes. Les fractions sont ensuite isolées sur gradient comme il a été décrit plus haut.

b₂ - Mélange de microsomes marqués isolés de tissus en survie et de mitochondries non marquées isolées de tissu frais

0,5 ml de mitochondries isolées de tissus frais et remises en suspension dans le surnageant isolé de tissu en survie (Mit_{F,s}) sont mélangées à 0,5 ml de microsomes marqués (Mic_S⁺) en présence de surnageant isolé de tissu en survie (s).

b₃ - Mélange de surnageant cytoplasmique marqué et de mitochondries isolées de tranches fraîches ou en survie.

10 ml de surnageant cytoplasmique marqué (S)⁺ phase surnageante finale de la centrifugation qui nous a permis de recueillir les microsomes marqués, sont mélangés à 0,5 ml de mitochondries isolées de tranches en survie (Mit_S) ou à 0,5 ml de mitochondries isolées de tranches fraîches (Mit_F). L'incubation dure 90 minutes. Après refroidissement du mélange pendant 30 minutes dans de la glace, une centrifugation de l'ensemble à 10.000 g pendant 15 minutes permet de récupérer les mitochondries qui sont alors soumises à deux lavages successifs.

2) Résultats.

a) Echanges globaux de phospholipides.

En mesurant la radioactivité totale des phospholipides des différentes fractions cellulaires placées préalablement en incubation mixte pendant des temps variables et en dosant les phospholipides, nous avons déterminé les variations de la radioactivité totale et de la radioactivité spécifique des phospholipides.

Le tableau XXXVIII rassemble les différents résultats obtenus. Il

convient de noter que dans tous les cas, on observe une décroissance de la radioactivité totale et de la radioactivité spécifique de la fraction microsomale initialement marquée et une augmentation progressive de la radioactivité des fractions cellulaires initialement non radioactives. Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus avec des fractions isolées de tranches fraîches, indiquant déjà que des échanges de phospholipides existent dans les tissus aussi bien après qu'avant survie.

Recherchons à présent les différences en fonction de l'état physiologique des tissus.

a_1 - Mitochondries (survie) et surnageant (survie).

Les variations de radioactivité spécifique et totale sont rapides et intenses. Dès les 30 premières minutes, la radioactivité spécifique des mitochondries atteint le tiers de celle des microsomes : la radioactivité spécifique des phospholipides mitochondriaux augmente rapidement pendant 90 minutes d'incubation.

a_2 - Mitochondries (survie) et surnageant (frais).

Dès 30 minutes, les mitochondries sont très marquées, à peu près de la même façon que les mitochondries (en survie) en présence de surnageant cytoplasmique isolé de tranches en survie : ce surnageant ne semble donc pas influencer fortement les échanges de phospholipides entre organites, puisque toutes les conditions sont égales par ailleurs. Deux interprétations sont possibles : 1) les facteurs du surnageant qui activent les échanges seraient présents en grandes quantités, aussi bien dans les tranches fraîches que dans celles en survie ; 2) le facteur limitant l'intensité des échanges serait l'état physiologique des mitochondries elles-mêmes qui contrôlerait en quelque sorte le rythme de l'échange des phospholipides.

a₃ - Mitochondries (fraîches) et surnageant (survie).

Si l'on compare l'apparition et l'évolution de la radioactivité des phospholipides dans les mitochondries isolées de tranches en survie et dans les mitochondries isolées de tranches fraîches en présence de surnageant cytoplasmique (survie), on s'aperçoit que les radioactivités spécifiques des phospholipides des mitochondries "fraîches" sont nettement plus faibles. Etant donné que les quantités des phospholipides mitochondriaux introduites sont les mêmes que dans l'expérience décrite dans le paragraphe précédent, on peut conclure que les mitochondries isolées de tranches fraîches ont accepté moins de phospholipides que les mitochondries de tranches en survie. Ce résultat s'accorde bien avec l'une des deux hypothèses précédentes et suggère que les mitochondries isolées de tissu fraîchement prélevé sont moins susceptibles de recevoir des phospholipides que les mitochondries provenant de tissu en survie.

a₄ - Mélange du surnageant cytoplasmique marqué et de mitochondries isolées de tissu en survie ou de mitochondries isolées de tissu frais.

Lorsqu'on mélange une quantité identique de surnageant cytoplasmique contenant des phospholipides marqués à des mitochondries isolées de tranches fraîches ou à des mitochondries isolées de tranches en survie, on observe à nouveau que les phospholipides des mitochondries en survie ont une radioactivité spécifique plus élevée que les phospholipides des mitochondries isolées de tissu frais. Cette différence est significative et a été retrouvée dans 3 expériences différentes.

b) Echanges globaux d'acides gras.

L'étude de la radioactivité totale et spécifique des acides gras des fractions cellulaires, mélangées dans les conditions expérimentales identiques à celles décrites dans les paragraphes précédents, permet de retrouver les caractéristiques mises en évidence au niveau des phospholipides. En effet on constate (*tableau XXXIX*): 1) l'apparition puis l'augmentation progressive d'une radioactivité spécifique dans les acides des mitochondries initialement

Echanges de lipides entre fractions cellulaires isolées de tissu frais ou de tissu en survie. Evolution des radioactivités spécifiques des acides gras des fractions cellulaires mélangées selon les conditions expérimentales expliquées dans le tableau XXXVII (exprimées en cpm. μ g acides gras).

On a indiqué ici les résultats d'une expérience, typiques de ceux obtenus dans 3 expériences différentes.

Temps (en mn)	0	30	60	90
Mic_S^*	7650	6600	6050	5500
Mit_S, s	0	1265	1430	2020
Mic_S^*	7650	6200	6150	5890
Mit_S, f	0	1465	1560	1850
Mic_S^*	7650	7100	6500	6430
Mit_F, s	0	980	1020	1540
S^*	2920	—	—	2530
Mit_S, s	0	—	—	920
S^*	2920	—	—	2510
Mit_F, s	0	—	—	780

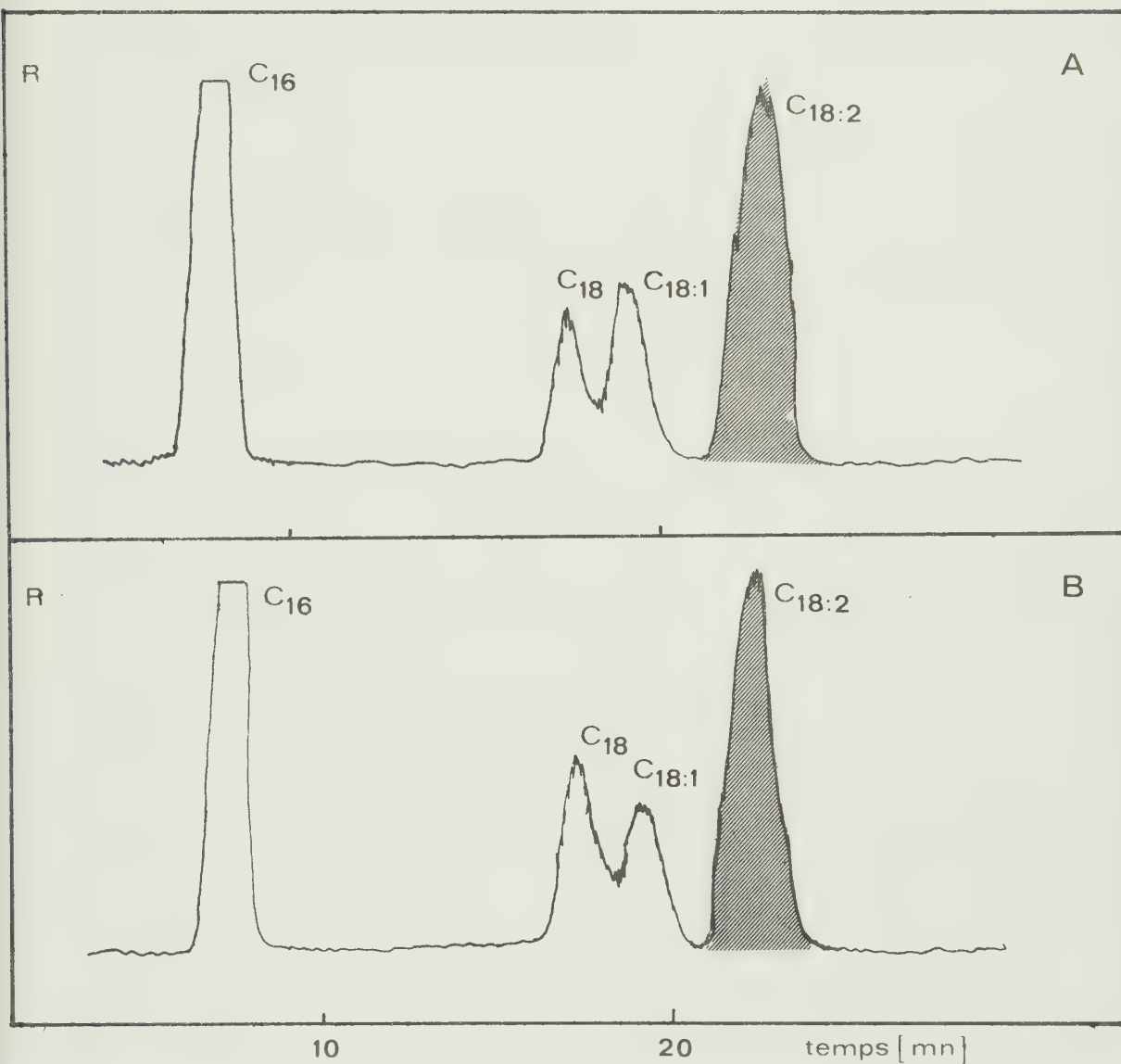


Fig. 55

Echanges d'acides gras in_vitro entre microsomes et mitochondries de tranches en survie.

Les mélanges expérimentaux sont donnés dans le texte.

En A : microsomes initialement radioactifs (après 60 mn d'incubation avec des mitochondries non marquées)

En B : mitochondries initialement non marquées (après 60 mn d'incubation avec des microsomes radioactifs)

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

TABLEAU XL

Echanges d'acides gras entre les microsomes, mitochondries et surnageant cytoplasmique isolés de tranches de tubercule fraîchement coupées ou préalablement maintenues en survie.

Dans le présent tableau sont indiqués les pourcentages de radioactivité des acides gras totaux (%) ou les radioactivités spécifiques exprimées par rapport au microgramme d'acides gras (cpm/ μ g) (ces dernières valeurs sont indiquées entre parenthèses).

Temps (mn)	Mic _S	Mit _{S,s}	Mit _{S,f}	Mit _{F,s}	S	Mit _{F,s}	Mit _{S,s}
acides gras	0	90	90	90	0	90	90
C ₁₆	45,3 (11.680)	39,7 (5.800)	35,1 (3.200)	42,7 (2.020)	44,8 (5.100)	54,5 (2.670)	48,5 (1.940)
C ₁₈	10,1 (10.800)	15,0 (2.760)	16,3 (3.930)	13,2 (1.570)	13,4 (3.520)	11,6 (2.280)	16,9 (1.870)
C _{18:1}	8,1 (13.050)	5,9 (1.670)	12,2 (3.910)	13,8 (1.960)	15,6 (2.340)	6,3 (1.340)	12,3 (1.980)
C _{18:2}	36,5 (5.110)	39,3 (1.250)	36,2 (1.290)	30,3 (412)	26,2 (792)	27,6 (350)	22,2 (372)

non marquées.

2) la diminution de la radioactivité spécifique des acides gras des microsomes ainsi que du surnageant initialement radioactif.

3) une plus grande radioactivité spécifique des acides gras des "mitochondries" receveurs lorsque celles-ci ont été isolées de tissu en survie.

Cet ensemble de résultats confirme que le comportement des molécules d'acides gras échangées est étroitement lié à celui des molécules phospholipidiques. L'insertion des acides gras dans les membranes mitochondriales dépend des caractéristiques physiologiques des mitochondries elles-mêmes. Ces organites "acceptent" mieux les lipides lorsqu'ils proviennent d'un tissu maintenu en survie.

c) Nature des acides gras échangés.

Dans le cas des organites isolés de tranches fraîches, les acides gras échangés étaient surtout des acides saturés et monoinsaturés, puisque l'acide *linoléique* n'était pas marqué dans le tissu frais. Puisque les microsomes, dans les expériences que nous commentons à présent, ont été isolés de tranches préalablement maintenues en survie après incubation d'acétate radioactif, on doit donc s'attendre à ce que ces organites contiennent des molécules d'acide *linoléique*. Par radiochromatographie en phase gazeuse, nous avons vérifié que l'acide *linoléique* est très radioactif (Tableau XL) (Fig. 55). Cette nouvelle situation va nous permettre de répondre aux questions suivantes : est-ce que l'acide *linoléique* des microsomes peut être transféré vers les mitochondries ? est-ce que les mitochondries, isolées des tranches fraîches et qui normalement ne contiennent pas l'acide *linoléique* marqué, après incubation en présence d'acétate, sont capables de recevoir cet acide *linoléique* venant de tissus en survie ? est-ce que ce transfert est aussi intense dans les mitochondries en survie ?

Les mitochondries en survie ou les mitochondries des tissus frais, contiennent, dès 30 mn, des molécules d'acide *linoléique* marqué, comme le montrent le tableau XL et le radiochromatogramme de la figure 55.

Il y a peu de différence entre les pourcentages relatifs de radioactivité présents dans les acides gras des fractions cellulaires, par rapport aux microsomes donneurs, ce qui implique un échange d'acides gras sans dégradation ni resynthèse.

Les mitochondries isolées de tissu frais sont donc tout à fait capables de recevoir des molécules d'acide *linoléique* marquées. La radio-activité spécifique de l'acide *linoléique* de cette fraction est cependant inférieure à celle de l'acide *linoléique* des mitochondries isolées de tissus en survie, ce qui signifie probablement que les mitochondries isolées de tranches fraîches sont dotées d'une capacité moins élevée d'absorption de l'acide *linoléique* exogène.

Une même différence s'observe quand on examine les échanges d'acide *linoléique* entre le surnageant cytoplasmique et les mitochondries isolées de tranches fraîches ou en survie.

3) Conclusions.

L'étude des échanges de phospholipides et d'acides gras entre fractions cellulaires isolées de tranches de tubercule en survie a donné des résultats intéressants : les échanges semblent plus actifs entre organites isolés de tissu en survie qu'entre organites isolés de tranches fraîches. Cette intensification des échanges ne serait pas due à la composition du surnageant cytoplasmique, mais plutôt aux caractéristiques propres des membranes.

On peut relier cette observation aux reprises importantes des activités métaboliques mitochondriales pendant la survie et à la biogénèse de nouveau matériel mitochondrial. L'état physiologique de la mitochondrie pourrait jouer un grand rôle dans ces échanges, exerçant à certains moments de la vie de la cellule un appel plus important des phospholipides,

L'autre résultat intéressant est l'insertion possible dans les mitochondries des molécules d'acide *linoléique* initialement présentes dans les membranes microsomales. Le phénomène confirme l'hypothèse d'un apport extérieur d'acide *linoléique* pour que la mitochondrie réalise son équipement lipidique complet. On peut donc supposer que la mitochondrie pendant la survie reçoit progressivement l'acide *linoléique* indispensable à sa biogénèse.

C - ECHANGES DE LIPIDES IN VIVO.

Les expériences décrites ci-dessus démontrent donc qu'il se produit, *in vitro*, des échanges de lipides entre fractions cellulaires isolées. Une réserve importante peut être faite sur la signification biologique de cet ensemble de résultats : la nécessité de détruire l'architecture cellulaire pour isoler les organites et réaliser les mélanges expérimentaux interdit peut-être toute transposition à la situation réelle des organites, dans leur contexte cellulaire normal. Autrement dit, si les échanges de lipides existent *in vitro*, existent-ils aussi *in vivo* ? Il est difficile de répondre à cette question par des preuves directes, mais des démonstrations indirectes sont possibles.

Nous avons déjà montré, dans de nombreuses expériences, que lorsqu'un précurseur radioactif est fourni à des tranches de tubercule, avant ou après survie, la fraction microsomale est toujours plus marquée que la fraction mitochondriale. Nous allons donc essayer de déceler à l'aide des cinétiques de marquage quel lien peut exister entre les lipides des mitochondries et ceux des microsomes *in vivo*.

1) Incorporation de précurseurs radioactifs in vivo.

Quel que soit le temps d'incubation ou les précurseurs choisis et à condition que le précurseur radioactif demeure constamment présent dans le milieu d'incubation, les phospholipides des microsomes restent plus radioactifs que ceux des mitochondries. La radioactivité spécifique des phospholipides est 3 à 4 fois plus élevée dans les microsomes que dans les mitochondries.

Lorsque des temps longs d'incubation sont utilisés, les radioactivités spécifiques des phospholipides des mitochondries tendent à se rapprocher de celles des phospholipides des microsomes ; ce phénomène peut s'expliquer par un épuisement progressif du milieu d'incubation en précurseur radioactif, ce qui permet d'observer les phénomènes de transfert que nous allons évoquer.

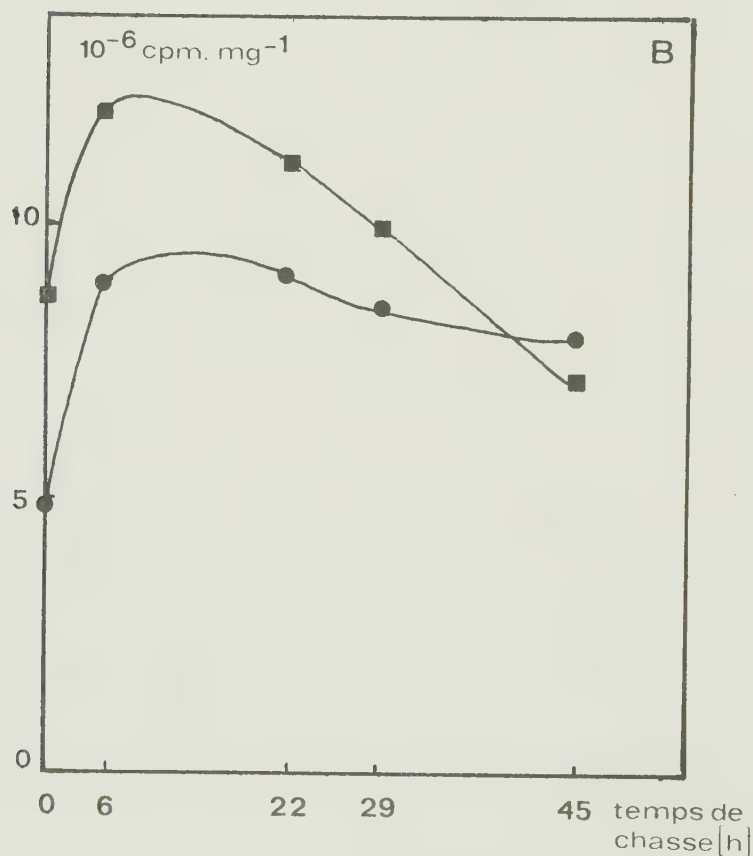
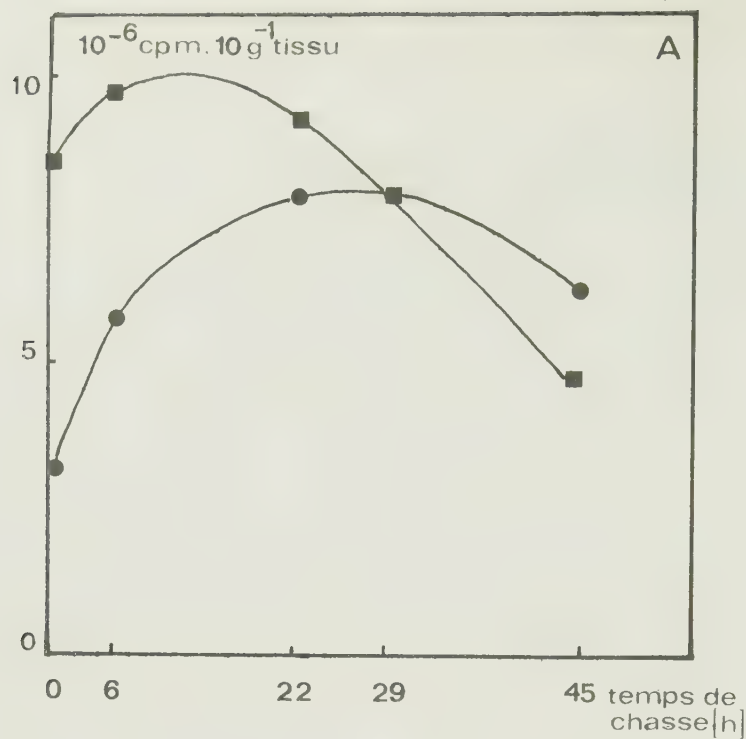


Fig. 56

Cinétiques de marquage *in vivo* des phospholipides de diverses fractions cellulaires de pomme de terre.

Les tranches ont été mises en incubation pendant deux heures dans une solution d'acétate marqué ($4 \mu\text{Ci/ml}$), puis transférées dans un milieu non radioactif.

En A : radioactivités totales des phospholipides en cpm par 10 g de tissu

En B : radioactivités spécifiques (en cpm/mg phospholipides).

2) Expériences de "Chasse" de la radioactivité incorporée.

a) Long temps de marquage initial.

a₁ - Réalisation expérimentale.

On place des tranches de tubercule fraîchement coupées en présence d'(1-¹⁴C)-acétate pendant 4 heures, puis on rince abondamment les tranches de tissu et on les transfère sur milieu sans précurseur radioactif. A intervalles variables (jusqu'à 45 h) les tranches sont prélevées, les microsomes et les mitochondries sont isolés.

a₂ - Résultats.

Les phospholipides des microsomes ont, dès le départ, une radioactivité totale ou spécifique plus élevée que les phospholipides mitochondriaux (Fig. 56). Après un maximum, on observe une diminution de la radioactivité totale des phospholipides microsomaux, tandis que le maximum de radioactivité des phospholipides mitochondriaux se produit plus tard. Après 45 heures, la radioactivité totale ou spécifique des phospholipides mitochondriaux dépasse légèrement celle des phospholipides microsomaux.

a₃ - Discussions.

Ces cinétiques de marquage peuvent déjà suggérer des transferts de lipides des microsomes vers les mitochondries. Des résultats semblables ont été obtenus par THIBAUDIN (1970) sur le parenchyme de Pomme ou par BEN ABDEL-KADER et MAZLIAK (1970) sur le tissu de Chou-fleur. D'autre part des résultats très voisins ont été signalés par BYGRAVE (1969) sur les fractions cellulaires de foie de Rat.

b) Bref temps de marquage initial.

On peut critiquer les résultats que nous venons de décrire en re-

marquant que les phénomènes observés dans ces expériences se produisent en plusieurs dizaines d'heures alors que les échanges étudiés *in vitro* se produisent en quelques dizaines de minutes. Nous avons recherché les raisons possibles de cette discordance apparente, en agissant tout d'abord sur les temps de marquage initial et ensuite sur la technique d'incorporation du précurseur radioactif.

b₁ - Réalisation expérimentale.

Dans ces expériences, nous administrons le précurseur radioactif, pendant seulement 30 minutes, à des tranches de tubercule en survie. Dans la technique classique, on place les rondelles dans la solution radioactive de façon à ce qu'elles soient immergées et constamment agitées. Dans cette série d'expériences, la solution radioactive est directement déposée en gouttes à la surface des rondelles (1 ml de solution de (1-¹⁴C)-acétate (10 µCi/ml) ou de (Me¹⁴C)-choline (10 µCi/ml) pour 10 rondelles). Cette quantité de liquide suffit pour que la surface des rondelles soit constamment couverte d'un film liquide pendant les 30 mn d'incubation (un léger film d'eau distillée est aussi déposé au fond de la fiole d'expérience). Après 30 minutes d'incubation, les rondelles sont abondamment rincées et remises en incubation dans de l'eau distillée contenant du sulfate de calcium (10⁻⁴ M).

Cette technique permet d'introduire rapidement les précurseurs radioactifs dans les pools métaboliques impliqués dans la synthèse des acides gras et des phospholipides ; pour bien cerner le phénomène, nous avons à la fois utilisé l'acétate et la choline marqués pour suivre le devenir des restes acylés et de la partie choline de la phosphatidylcholine, le phospholipide le plus important en masse.

A intervalles de temps variables (jusqu'à 120 minutes), les fractions cellulaires sont isolées à partir de 10 g de rondelles (31 rondelles) en les broyant dans 10 ml de milieu de broyage, comme indiqué plus haut (cf. Méthodes expérimentales). L'homogénat total obtenu après passage sur gaze (10 ml) est déposé directement sur des couches de saccharose de densité croissante (la composition de ces solutions a été indiquée plus haut) en modifiant le volume de chaque couche de façon à ce que l'ensemble des solutions ait un volume final de 17 ml. Après centrifugation à 30.000 g pendant 1 heure, les mito-

chondries et les microsomes sont prélevés à l'aide d'une pipette recourbée. Cette technique permet une parfaite reproductibilité des isolements des fractions cellulaires.

b₂ - Résultats.

(Me¹⁴C)-choline.

Ce précurseur est essentiellement incorporé dans la *phosphatidylcholine*. Près de 93% de la radioactivité totale se retrouve dans la *phosphatidylcholine*. La phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol sont contaminés par une faible proportion de choline radioactive : respectivement 4,2 et 2,8% ; ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus récemment par DEVOR et MUDD (1971a) sur des fractions isolées de Chou-fleur et qui montrent que la choline marquée s'incorpore essentiellement dans la phosphatidylcholine. Les récentes observations de CASTELFRANCO et al. (1971) ont aussi montré que la choline pouvait s'incorporer *in vivo* dans les lipides des membranes microsomales, mais sans préciser les phospholipides ainsi marqués.

Pendant la "chasse" en milieu non radioactif, la somme des radioactivités totales de toutes les fractions mesurées à un moment donné reste constante. Il n'y a donc pas de synthèse ou de dégradation importantes dans les deux heures d'expérience. Au début de l'expérience, les radioactivités totales ou spécifiques des phospholipides microsomaux sont beaucoup plus élevées que celles des phospholipides mitochondriaux. Ces valeurs diminuent rapidement dès le transfert en milieu non marqué ; la décroissance de la radioactivité spécifique des phospholipides microsomaux s'observe tout au long de l'expérience ; les mitochondries (*Fig. 57*), par contre, contiennent des phospholipides dont la radioactivité augmente d'abord rapidement, puis plus lentement à partir de 120 mn. La radioactivité spécifique de la phosphatidylcholine mitochondriale ne rejoint pas, cependant, même après 240 mn de chasse, la radioactivité spécifique de la phosphatidylcholine microsomale.

(1-¹⁴C)-acétate.

L'utilisation du précurseur (1-¹⁴C)-acétate de sodium à la place de la choline marquée révèle des évolutions similaires des radioactivités spécifiques des phospholipides microsomaux et mitochondriaux ; cependant,

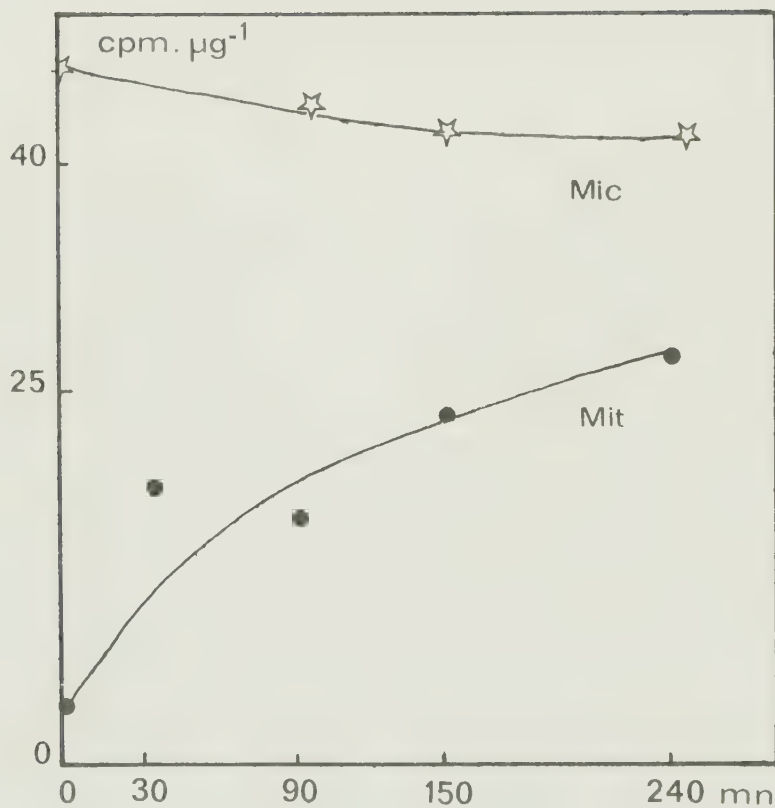


Fig. 57

Evolution
des radioactivités spécifiques des phospho-
lipides des microsomes(mic) et des mito-
chondries (mit) isolés de tranches en sur-
vie, préalablement mises en incubation en
présence de choline marquée pendant 30 mn,
puis transférées en milieu non radioactif
jusqu'à 240 mn.
Les radioactivités spécifiques sont expri-
mées en cpm par microgramme de phospholipi-
des.

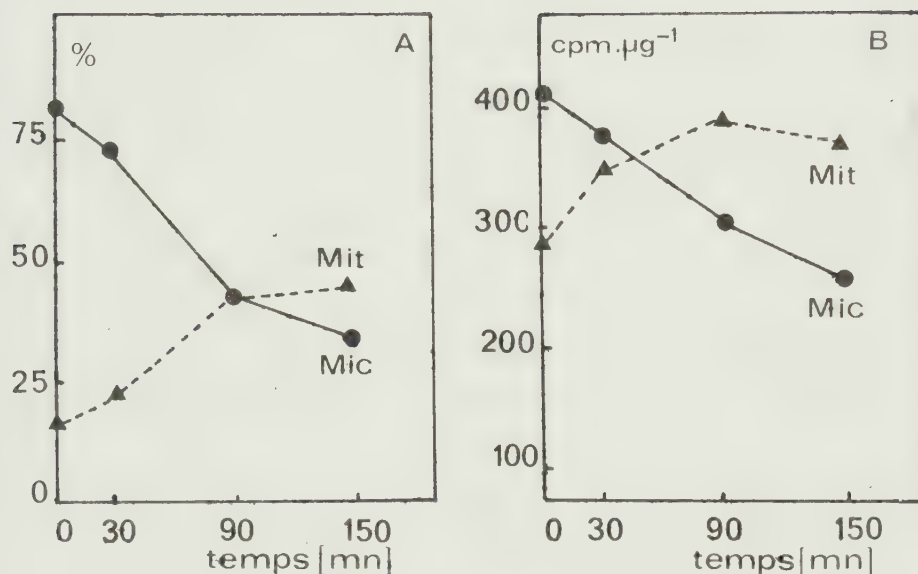


Fig. 58

Evolution des radioactivités des phospholipides des microsomes et des mitochondries isolés de tranches en survie . Ces tranches ont été préalablement mises en incubation dans une solution d'acétate marqué pendant 30 mn, puis laissées dans un milieu non radioactif pendant des temps variables, indiqués en abscisse.

En A, ont été indiqués les pourcentages de radioactivité totale retrouvés dans chaque fraction.

En B, ont été indiquées les radioactivités spécifiques exprimées en cpm par microgramme de phospholipide.

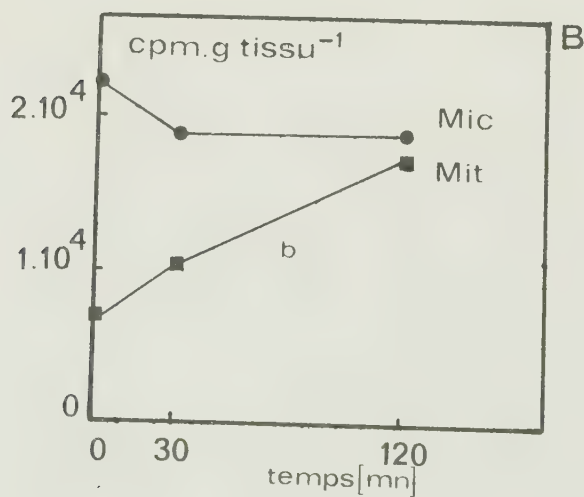
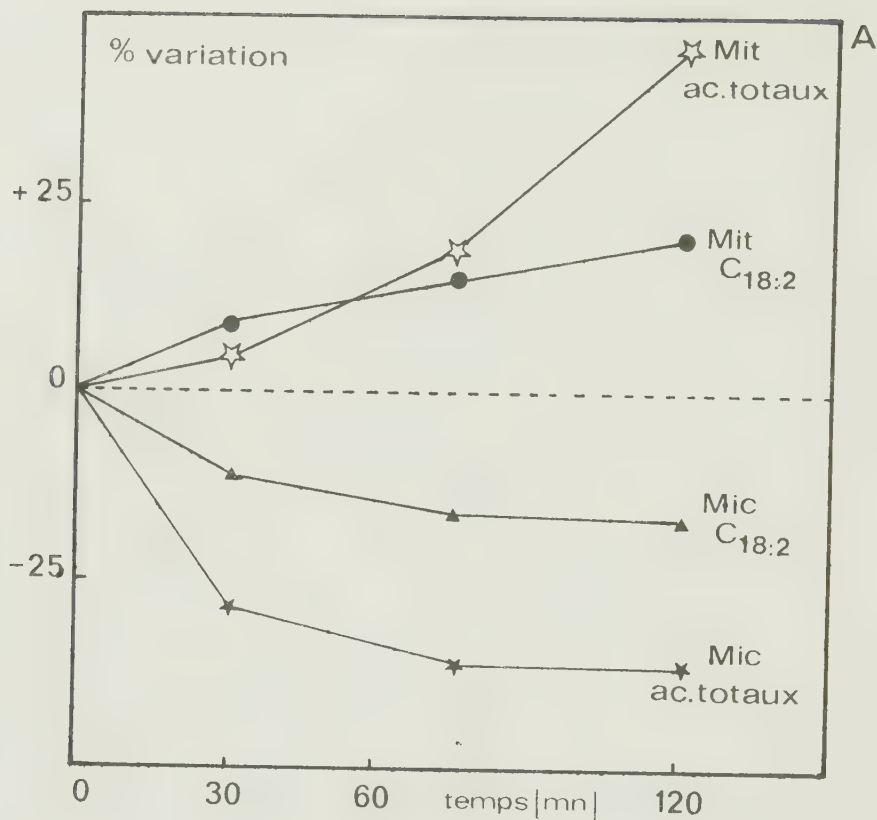


Fig. 59

Echanges d'acides gras in vivo

- A- Evolution des radioactivités spécifiques des acides gras totaux (ac.totaux) et de l'acide linoléique (C18:2) des microsomes (Mic) et des mitochondries isolés de tranches ayant subi le traitement expliqué dans la figure 58. On a représenté en ordonnée les variations de radioactivité spécifique (en % par rapport à la radioactivité au temps zéro du transfert en milieu non marqué).
- B- Evolution des radioactivités totales de l'acide linoléique des microsomes et des mitochondries isolés de tranches ayant subi le traitement évoqué dans la figure 58.

des différences importantes existent entre les résultats apportés par l'utilisation de ces deux précurseurs.

On peut tout d'abord remarquer (*Fig. 58*) que si la radioactivité spécifique des phospholipides marqués à l'acétate est plus importante dans les microsomes que dans les mitochondries, après 30 mn de marquage, la différence est beaucoup moins importante qu'avec la (Me¹⁴C)-choline. La décroissance de la radioactivité spécifique est plus accentuée et plus rapide dans les phospholipides microsomaux, avec l'acétate qu'avec la choline. D'autre part, les radioactivités spécifiques des phospholipides mitochondriaux augmentent constamment et rapidement pendant l'expérience.

Les échanges observés en prenant l'acétate radioactif comme précurseur semblent donc plus actifs. Ceci rejoint les résultats des expériences *in vitro* qui nous avaient donné l'idée de rechercher des échanges d'acides gras ; nous avons trouvé qu'*in vitro* l'acide *linoléique* pouvait être échangé activement. En est-il de même *in vivo* ?

On peut suivre cet échange *in vivo* en analysant la distribution de la radioactivité dès le début de la "chasse"; un intérêt supplémentaire est du au fait que les tissus mis en incubation sont préalablement maintenus en survie. Les pourcentages de radioactivité totale des acides gras des mitochondries et des microsomes sont semblables. La radioactivité spécifique des acides gras totaux des microsomes diminue constamment pendant les 180 minutes d'expérience alors que celle des mitochondries augmente constamment (*Fig. 59*). Dans les microsomes, la désaturation de l'acide *oléique* en acide *linoléique* se retrouve lorsque l'on examine les variations respectives des pourcentages de radioactivité (*Fig. 60*). Dans les mitochondries, le pourcentage de radioactivité localisé dans l'acide *linoléique* reste constamment élevé ou augmente légèrement. La radioactivité spécifique de l'acide *linoléique* microsomal diminue constamment, alors que celle de l'acide *linoléique* mitochondrial s'accroît.

b₃ - Discussions.

Dans ces expériences de brève incorporation du précurseur, suivie d'une période de chasse de 1 à 2 heures, quel que soit le précurseur, on observe une décroissance de la radioactivité spécifique des lipides (phospholipides ou acides gras) des microsomes, accompagnée d'une augmentation

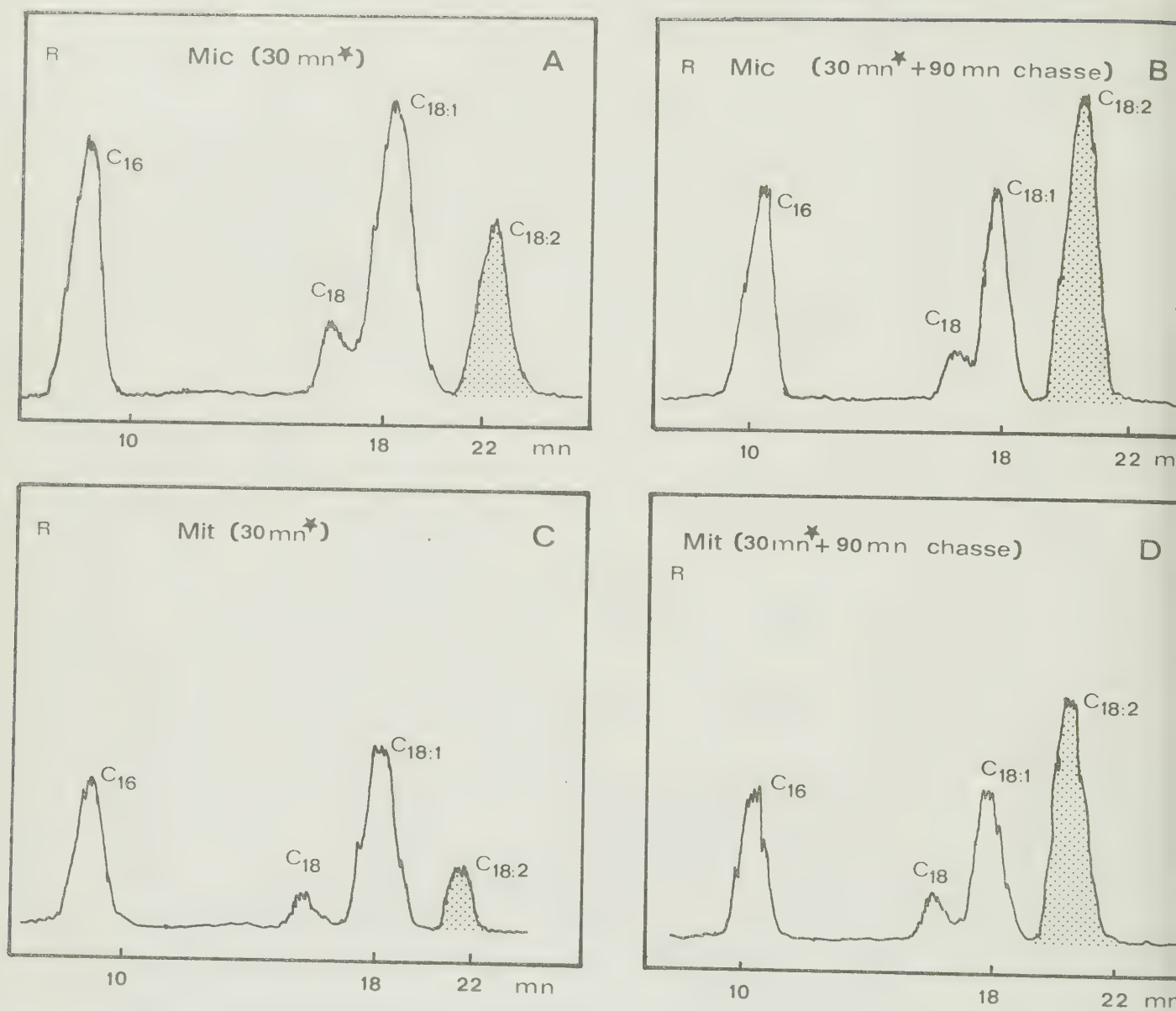


Fig. 60

Biosynthèse et échange d'acides gras in vivo.

Après un temps de marquage bref (30 mn) (A ou C) dans une solution d'acétate radioactif, les tranches de tissu (préalablement maintenues en survie) sont transférées dans un milieu non marqué pendant 90 mn (B ou D). Les radiochromatogrammes A et B concernent les fractions microsomales, les radiochromatogrammes C et D , les fractions mitochondriales.

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

parallèle de la radioactivité spécifique des lipides mitochondriaux, la somme totale des radioactivités des fractions à un moment donné restant constante tout au long de l'expérience.

Cette évolution des radioactivités spécifiques présente une analogie frappante avec les résultats obtenus *in vitro* et suggère l'existence d'échanges de lipides *in vivo* ; les lipides radioactifs, quittant les microsomes et arrivant aux mitochondries, augmentent la radioactivité spécifique des lipides mitochondriaux ; un échange réciproque explique une partie de la décroissance de la radioactivité microsomale.

Nous pensons pouvoir rejeter les interprétations suivantes :

1. la diminution de la radioactivité spécifique des phospholipides microsomaux serait due à une dégradation préférentielle des lipides. Cette interprétation peut être écartée parce qu'une telle dégradation provoquerait une décroissance de la radioactivité totale et non celle de la radioactivité spécifique des phospholipides
2. l'augmentation de la radioactivité spécifique des phospholipides mitochondriaux serait due à une synthèse de phospholipides par les mitochondries elles-mêmes. Tous les arguments accumulés concernant les capacités limitées de synthèse lipidique par les mitochondries isolées vont à l'encontre de cette interprétation. D'autre part, il s'agit dans cette expérience, d'une redistribution de molécules lipidiques radioactives et non de synthèses nettes (puisque la somme de la radioactivité totale de toutes les fractions à un moment donné ne varie pas).
3. la diminution de la radioactivité spécifique microsomale serait due à une synthèse importante de molécules de phospholipides ou d'acides gras, non marquées, qui viendraient diluer le pool lipidique microsomal en même temps qu'une partie des lipides initiaux serait dégradée. Cette hypothèse paraît peu vraisemblable ; en effet pour expliquer la décroissance importante de la radioactivité spécifique (37%), elle impliquerait une synthèse importante de phospholipides microsomaux non marqués qui entraînerait une augmentation importante en masse, ce que ne montrent pas les dosages. D'autre part cette hypothèse d'un renouvellement important (synthèse et dégradation) s'oppose aux temps de demi-vie mesurés pour les phospholipides des fractions cellulaires et qui sont de l'ordre de plusieurs jours (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1971), aussi bien pour le tissu normal que pour le tissu en survie, ce qui ne peut s'accorder aux variations rapides observées ici, grâce à la technique du marquage très bref.

Il nous paraît donc raisonnable d'imaginer que les variations de la radioactivité spécifique des fractions cellulaires sont le résultat d'échanges de lipides entre mitochondries et microsomes.

Le fait que les échanges sont moins actifs avec la choline marquée qu'avec l'acétate radioactif signifie probablement que des échanges d'acides gras se surajoutent aux échanges de molécules phospholipidiques entières.

Les chercheurs travaillant sur le foie de Rat ont abouti à la mise en évidence de tels échanges *in vivo* de phospholipides : expériences de KADENBACH (1968a), BEATTIE (1969), JUNGALWALA et DAWSON (1970), WOJTCZAK et al. (1971), SAUNER et LEVY (1971), BLOK et al. (1971) qui analysent la décroissance de la radioactivité spécifique des phospholipides des fractions cellulaires, travaux de WIRTZ et ZILVERSMIT (1969b) qui étudient l'effet de drogues, études autohistoradiographiques de STEIN et STEIN (1967) (1969).

D - CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS GENERALES SUR LES ECHANGES INTRACELLULAIRES
=====

DE LIPIDES.
=====

1) Mécanismes proposés pour expliquer ces échanges.

Comment s'effectuent ces échanges de phospholipides entre les fractions cellulaires *in vitro* ou *in vivo* ? Essayer de répondre à cette question soulève des problèmes importants ayant trait à la structure et au comportement des membranes.

a) Hypothèse du facteur protéique de WIRTZ et ZILVERSMIT.

Le surnageant cytoplasmique joue un rôle important dans les échanges de phospholipides, puisque le remplacer par une solution tamponnée diminue l'efficacité des échanges ; cependant, WIRTZ et ZILVERSMIT (1969a), en traitant ce surnageant à pH 5,1, ce qui élimine la plus grande partie des phospholipides, ont montré que le rôle du surnageant n'est pas d'aider à la formation de complexes lipoprotéiques qui permettraient le transport des

phospholipides dans les milieux aqueux.

A partir de 50 g de protéines de coeur de Boeuf, WIRTZ et ZILVERSMIT (1970) ont réussi à isoler 200 mg d'une protéine stimulant fortement et spécifiquement les échanges de phosphatidylcholine et de phosphatidylinositol entre les microsomes et les mitochondries du foie de Rat. Ce facteur protéique stimule les transferts de lipides dans de nombreux systèmes biologiques : 1) selon WIRTZ et ZILVERSMIT (1969a), il stimule les échanges de phospholipides qui existent entre les mitochondries et les lipoprotéines du plasma (TARLOV, 1968).

2) le facteur protéique stimule les échanges de phospholipides entre chylomicrons et mitochondries, entre émulsions graisseuses et mitochondries, entre liposomes et mitochondries (ZILVERSMIT, 1971a et b). Le fait que ce facteur protéique puisse agir sur les échanges entre des phospholipides contenus dans des agrégats de lipides ou des émulsions artificielles suggère que ce facteur protéique pourrait exercer son rôle en altérant la conformation d'un ou de plusieurs compartiments membranaires, par exemple en affaiblissant les interactions entre lipides-lipides ou lipides-protéines des membranes ; on peut aussi suggérer que ce facteur libère un transporteur protéique des phospholipides par effet protéolytique puisque les agrégats de phospholipides étudiés par ZILVERSMIT (1971 a et b) ne comprenaient pas de protéines.

Cette relative non spécificité des échanges de phospholipides peut se retrouver dans les expériences réalisées entre espèces végétales différentes (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1970). En mélangeant des microsomes contenant des lipides marqués d'une espèce donnée (Pomme de terre par exemple) avec des mitochondries non marquées d'une autre espèce (Chou-fleur) en présence de surnageant cytoplasmique de cette espèce, on peut mettre en évidence des échanges de phospholipides entre ces fractions (d'autres expériences de mélanges réciproques ont été effectuées). Des échanges de phospholipides sont donc possibles entre organites d'espèces différentes, ayant une composition différente en acides gras (l'acide *linoléique* est l'acide gras majeur de la Pomme de terre, l'acide *linoléique* est l'acide gras le plus abondant dans le Chou-fleur). La possibilité d'échanges interspécifiques indique que la spécificité des échanges est assez limitée et ceci s'accorde bien avec les dernières expériences de ZILVERSMIT (1971b).

Cependant, si les échanges sont possibles entre ces deux espèces différentes, il convient de remarquer que dans ces conditions le surnageant

cytoplasmique devient très radioactif, particulièrement dans le cas où des microsomes ou des mitochondries marqués de Chou-fleur sont mélangés à des organites non marqués de Pomme de terre ; ceci suggère que des phospholipides marqués peuvent être libérés dans le surnageant et sont acceptés plus faiblement par les organites non marqués. L'insertion des phospholipides d'organites d'une certaine espèce serait moins facile dans les organites de l'autre espèce ; ceci pourrait donc refléter l'exigence spécifique de certains lipides pour réaliser les membranes mitochondriales d'un tissu donné.

b) Complexes de collision.

Cette hypothèse de DAWSON (1966) et McMURRAY et DAWSON (1969) est très séduisante parce qu'elle peut expliquer les données expérimentales *in vivo* et *in vitro*. Cette théorie a été émise pour rendre compte des échanges de phospholipides entre lipoprotéines du plasma.

La rapidité des échanges *in vitro* s'expliquerait aussi, puisque les risques de former des complexes de collision augmentent fortement lorsque l'on rassemble dans un faible volume des organites cellulaires normalement dilués dans la cellule.

Imaginer des collisions *in vivo* entre lipoprotéines des membranes ne présente pas de difficultés si l'on adopte les modèles moléculaires en sous-unités imaginés par certains auteurs pour les membranes. On comprend alors que des interactions puissent s'établir entre sous-unités lipoprotéiques voisines ; d'autre part des échanges entre membranes différentes peuvent se faire toujours entre sous-unités lipoprotéiques différentes. On peut retrouver *in vivo* certaines relations entre membranes intracellulaires.

Mouvements cytoplasmiques. Il est classiquement connu que de puissants mouvements cytoplasmiques existent dans la cellule vivante (cyclose). De tels mouvements sont plus importants dans les tranches de tubercule en survie que dans les tranches fraîches (STEWART et al., 1932). Les phénomènes de pinocytose sont bien connus. KAVANAU (1965) a imaginé, d'autre part, des changements de configuration structurale des membranes liés à leur état physiologique.

Continuité ultrastructurale entre compartiments membranaires différents. La continuité entre membrane nucléaire et réticulum endoplasmique a été plusieurs fois notée (WHALEY et al., 1964). Nous retrouvons un tel fait dans le

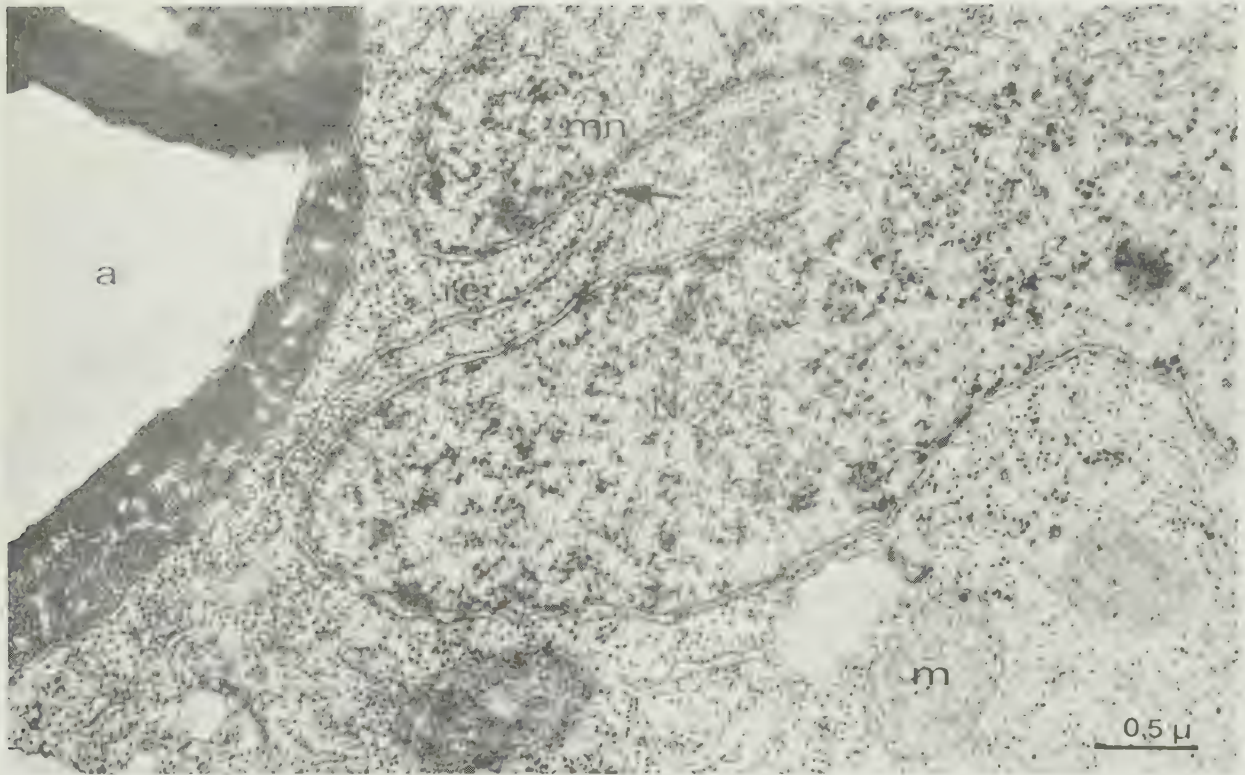


Fig. 61. Continuité entre la membrane nucléaire (mn) et le réticulum endoplasmique (rer) dans une zone cytoplasmique de cellule de tranche maintenue en survie.

parenchyme du tubercule de Pomme de terre où des images suggestives peuvent être trouvées (*Fig.61*).

Hypothèse du "flux de membranes". Selon MORRE, des transferts de constituants membranaires existent entre réticulum endoplasmique, golgi et membrane cytoplasmique. MORRE et al. (1971) attribuent à ce processus un rôle essentiel dans le remaniement et la distribution des membranes et des constituants membranaires de la cellule. Selon cette hypothèse, un transfert de constituants membranaires se produit continuellement des membranes du réticulum vers la membrane cytoplasmique en passant par l'appareil de golgi.

Réticulum endoplasmique ———→ golgi ———→ membrane cytoplasmique

Ce système pourrait servir au transport de constituants *in vivo*. Des transferts de glycoprotéines ont été effectivement montrés dans les cellules Hela (BOSMANN et al., 1969) ou encore des transferts de glycérides dans le foie de Rat (GLAUMAN, 1971) ; les phospholipides suivraient un même chemin, notamment dans *Tétrahymena pyriformis* (NOZAWA et THOMPSON, 1971) ou dans *Acanthamoeba palestinensis* (CHLAPOWSKI et BAND, 1971 a et b).

2) Importance physiologique des échanges de lipides.

Les échanges de lipides sont sans doute d'une importance physiologique pour la vie de la cellule, si l'on admet que seuls certains compartiments cellulaires sont dotés de systèmes enzymatiques pouvant mener à bien la synthèse complète des molécules phospholipidiques et des molécules d'acides gras. Ces échanges interviennent probablement dans plusieurs phénomènes essentiels (*Fig. 62*).

Biogénèse des membranes. On peut concevoir que les protéines membranaires structurales qui apparaissent dans le cytoplasme ou dans un organite trouvent dans leur entourage immédiat tous les lipides (notamment les phospholipides) nécessaires à la constitution définitive de la membrane. Ces lipides proviendraient de diverses régions de la cellule, soit directement des centres de biosynthèse des lipides, soit d'autres membranes intracellulaires libérant des lipides dans le cytoplasme.

Dans le cas des mitochondries, cet apport serait strictement indispensable, les mitochondries recevant des autres compartiments cellulaires une grande partie de leurs lipides et de leurs protéines (97% des protéines

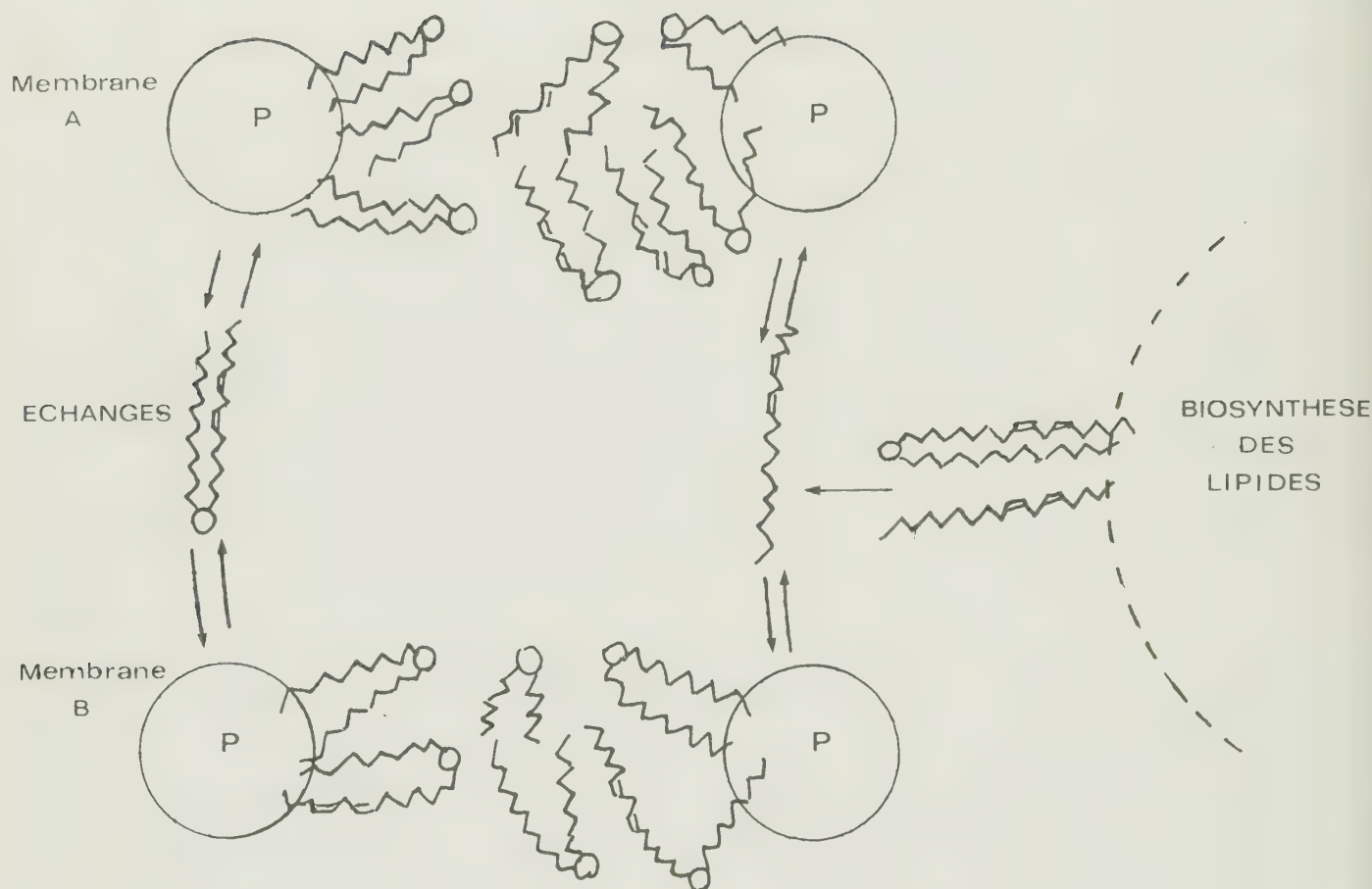


Fig. 62

Echanges de lipides entre membranes cellulaires du tubercule de pomme de terre. Hypothèses proposées.

P représente des molécules protéiques. Les molécules de phospholipides sont symbolisées par un petit cercle d'où partent deux traits en zigzag représentant chacun une molécule d'acide gras.

de la membrane externe mitochondriale animale viendraient du réticulum endoplasmique, d'après la littérature scientifique).

Renouvellement des constituants membranaires. Les échanges de lipides, se produisant même dans des cellules en équilibre physiologique, seraient responsables d'un renouvellement particulier et rapide des constituants lipidiques d'une membrane donnée, ne nécessitant ni synthèse, ni dégradation. Des renouvellements rapides ont été observés dans des fractions cellulaires animales (PASCAUD, 1964).

Apport de lipides nécessaires au fonctionnement des enzymes. On sait que les lipides sont indispensables au fonctionnement des enzymes ou complexes enzymatiques des tissus animaux (GREEN et FLEISCHER, 1963 ; GREEN et TZAGOLOFF, 1966 ; FLEISCHER et al., 1961) ou des tissus végétaux (JOLLIOT, 1970 ; JOLLIOT et MAZLIAK, 1971). Cette exigence se manifeste par la diminution de l'activité enzymatique des mitochondries, quand on extrait une partie de leurs constituants lipidiques ; la réassociation de lipides aux mitochondries délipidifiées provoque une restauration de l'activité enzymatique. Cette réassociation des lipides aux membranes mitochondriales - qui se fait *in vitro* - rejoint les problèmes d'échanges *in vitro* de lipides. Cette réassociation est difficile ; il est donc très utile de mieux connaître les impératifs physiochimiques et biophysiques de cette réassociation. L'étude précise du mécanisme des échanges de lipides *in vitro* peut apporter des données utiles pour résoudre ces problèmes. Les échanges de lipides *in vivo* seraient donc une nécessité vitale pour le fonctionnement de nombreuses enzymes membranaires. Les molécules lipidiques étant probablement soumises à une lente dégradation dans la cellule (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1971), cette dégradation risquerait de priver une membrane donnée en constituants lipidiques nécessaires si un apport extérieur de lipides ne venait compenser cette perte.

Apport de lipides exogènes venus de l'extérieur de la cellule. Nous savons que la cellule animale ne synthétise pas certains constituants lipidiques. Cette dépendance de la cellule animale nécessite absolument la présence de ces constituants dans la diète puis la distribution des constituants ingérés à tous les tissus et, dans les cellules, à tous les compartiments cellulaires. Cette nécessité de systèmes de transport et de distribution est particulièrement évidente pour l'acide *linoléique*, "acide gras essentiel", que la cellule animale doit nécessairement trouver à l'extérieur et qui, pourtant, fait partie de la structure de la membrane mitochondriale. Les échanges directs d'acide *linoléique in vitro*, que nous avons mis en évidence entre

fractions cellulaires du tubercule de Pomme de terre, constituent le premier essai de démonstration directe de tels échanges d'acides.

En ce qui concerne nos propres recherches, la lipogénèse dans le tubercule de Pomme de terre apparaît maintenant sous un jour nouveau. En effet, une série de résultats précédents :

- distribution homogène des chaînes d'acides gras dans toutes les fractions cellulaires
- biosynthèse limitée des phospholipides par les mitochondries isolées (et en particulier absence de synthèse de l'acide *linoléique*).
- insertion de molécules de phospholipides marquées (et d'acide *linoléique* marqué) dans toutes les membranes intracellulaires, prennent une signification nouvelle, les mitochondries recevant des microsomes, siège des désaturations, les molécules d'acide *linoléique* synthétisées.

Les échanges de lipides et d'acides gras, mis en évidence dans les tranches fraîches et les tranches en survie, rendent compte parfaitement de la distribution uniforme des acides gras synthétisés dans toutes les membranes cellulaires. On peut donc supposer que, dès la coupe du tissu, se déclenchent des synthèses de lipides et de protéines membranaires ; les constituants pourraient s'assembler pour former des membranes nouvelles (réticulum endoplasmique) fonctionnelles, puisque les systèmes enzymatiques sont actifs. Cet assemblage nécessiterait le transfert de lipides.

Les mitochondries, pour poursuivre leur "croissance", nécessiteraient aussi un apport constant de lipides et de protéines venus des nouvelles membranes microsomales.

VI - REGULATION GENETIQUE DE LA SURVIE

On peut raisonnablement penser qu'une dérégulation des potentialités génétiques des cellules se trouve à l'origine d'un certain nombre d'évènements qui se produisent au cours de la survie, notamment la synthèse des constituants membranaires, lipidiques et protéiques. Nous pouvons étudier les liens qui existent entre la biosynthèse des nouvelles protéines et l'induction de la synthèse lipidique, en faisant agir des antimétabolites bloquant plus ou moins fortement la synthèse protéique.

Nous rappelons dans le tableau XLI les effets les plus classiquement signalés de quelques antibiotiques inhibiteurs de la protéogénèse. Nous avons utilisé ces antibiotiques pour voir quelles perturbations éventuelles ils provoqueraient sur la survie de tranches de tubercules de Pomme de terre.

Pour ces expériences, le maintien en survie est effectué dans des erlenmeyers dans les conditions décrites plus haut ; dans chaque expérience, nous étudions systématiquement un témoin, constitué de tranches de tubercules maintenues en survie dans le milieu normal sans chloramphénicol. Les antibiotiques sont introduits dans le milieu de survie à des concentrations variables, concentrations qui seront indiquées dans le texte.

Dans toutes les expériences utilisant ces antibiotiques, les rondelles sont très abondamment rincées avant la mise en incubation en présence du précurseur radioactif. Les conditions d'incubation sont identiques à celles déjà décrites plus haut.

A - EFFET DES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE RIBOSOMALE (*puromycine*, ===== *cycloheximide*, *chloramphénicol*). =====

1) Modifications ultrastructurales - effet de la cycloheximide.

Si la cycloheximide a un effet inhibiteur sur la synthèse des protéines, elle doit empêcher la construction de nouvelles membranes, puisque les constituants indispensables - protéines - ne sont pas élaborés dans ces conditions. En examinant l'ultrastructure cellulaire après survie de tissus

TABLEAU XLI

Rappels sur les effets des inhibiteurs des synthèses de protéines et d'acides nucléiques.

	IN VITRO	IN VIVO
ACTINOMYCINE D	Inhibition de la synthèse ARN (REICH, 1963), (WELLS, 1963)	Inhibition de la synthèse protéique dirigée par la synthèse d'ARN (GOLDBLATT et al., 1970), (CLICK et HACKETT, 1963), (MASUDA, 1966), (RUTHERFORD, 1971)
PUROMYCINE	Inhibition de la synthèse protéique ribosomale (YARMOLINSKY et DE LA HABA, 1959), (REDMAN et SABATINI, 1966), (NATHANS, 1964)	Inhibition de la synthèse protéique
CYCLOHEXIMIDE	Inhibition de l'initiation et de l'extension des chaînes peptidiques (action exclusive sur les ribosomes 80 s cytoplasmiques) (LIN et al., 1966), (BALIGA et al., 1970), (DE KLOET, 1966), (O BRIG et al., 1971)	Inhibition de la synthèse protéique au niveau cytoplasmique. <u>Mais</u> action possible au niveau mitochondrial (ASHWELL et WORK, 1966, 1970), (LAMB et al., 1968), (ROUSLIN et SCHATZ, 1969), (HAWTHORNE et WILSON, 1952)
CHLORAMPHENICOL	Inhibition des liaisons peptidiques au niveau des ribosomes 70 s (bactéries, mitochondries, chloroplastes) (VASQUEZ, 1966), (DAVIS, 1969), (VASQUEZ et MONRO, 1967), (MARCUS et FEELEY, 1965), (PARISI et CIFERRI, 1966), (SO et DAULE, 1963), (ELLIS et Mac DONALD, 1968)	<u>Faibles doses</u> inhibition des synthèses protéiques mitochondriales (FIRKIN et LINNANE, 1968) <u>Fortes doses</u> inhibition des synthèses protéiques cytoplasmiques. inhibition de la croissance des tissus végétaux (JACOBY et SUTCLIFFE, 1962), (GRELLET et al., 1969), (JULIEN, 1971)

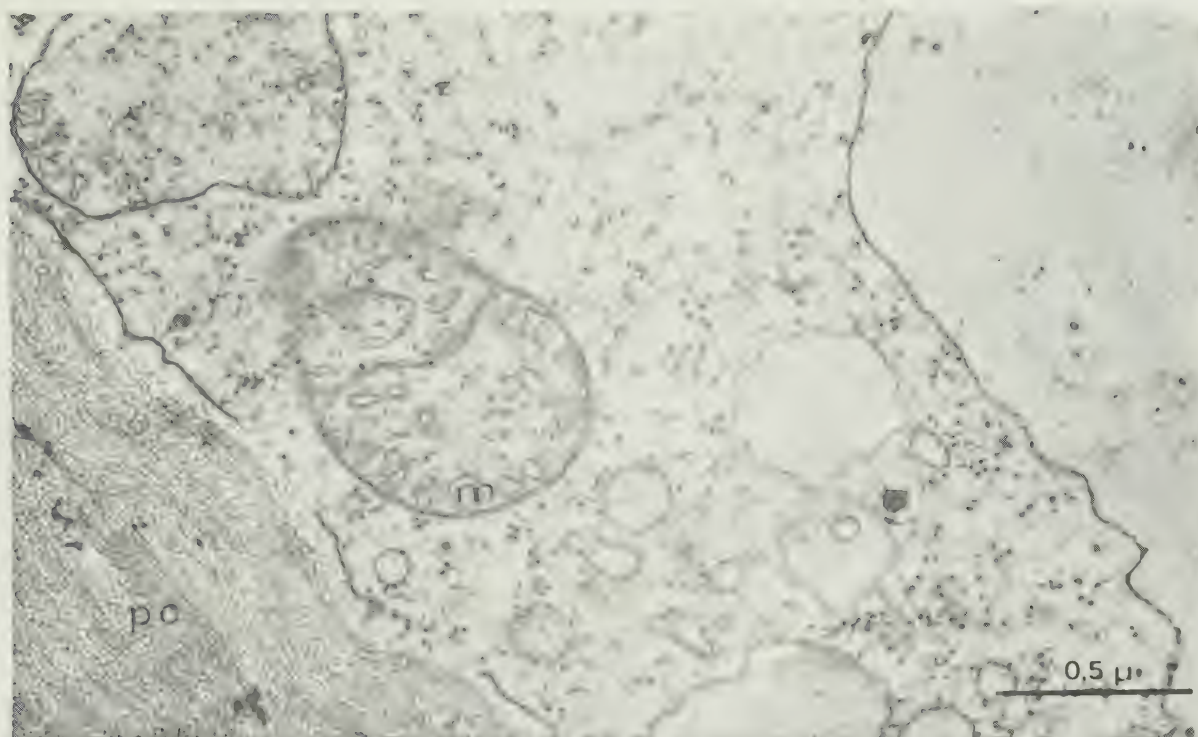


Fig. 63. Effets de la cycloheximide sur les modifications ultrastructurales provoquées par la survie. On n'observe plus de développement des profils du réticulum endoplasmique : l'aspect du cytoplasme rappelle celui des cellules des tranches fraîches.

en présence de cycloheximide, on ne doit donc pas observer de développement des profils du réticulum endoplasmique, caractéristique des tissus en survie normale.

Les observations en microscopie électronique confirment pleinement cette hypothèse ; l'aspect des cellules après survie en présence de cycloheximide est tout à fait analogue à l'aspect de *cellules de tissu frais* (Fig. 63) : cytoplasme peu dense, pauvre en ribosomes et profils du réticulum endoplasmique peu abondants. Ces images indiquent très nettement que la cycloheximide inhibe les remaniements cytologiques liés à la survie, toutes conditions (aération, coupe des tissus, temps de survie) étant égales par ailleurs.

Ces observations originales montrent la nécessité de la synthèse de nouvelles protéines pour construire les nouvelles membranes intracellulaires.

2) Variations de la teneur en protéines.

a) Cycloheximide.

Même à dose très faible (0,14 $\mu\text{g/ml}$) cet antibiotique inhibe d'une façon importante l'augmentation de la teneur en protéines des culots microsomaux et mitochondriaux pendant la survie. L'augmentation de la teneur en protéines microsomales est de 43% pendant la survie en conditions normales ; cette augmentation n'est que de 13% à la concentration de 0,14 $\mu\text{g/ml}$ (70% d'inhibition) (Tableau XLII).

A des doses plus élevées, 0,28 ou 0,56 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition est totale ; il se produit même une diminution par rapport au tissu frais.

Cet effet de la cycloheximide est réversible, à condition que la dose soit faible. Dans une expérience, nous avons introduit la cycloheximide pendant les 6 premières heures de survie, puis nous avons transféré les rondelles dans un milieu sans cycloheximide ; on observe dans ces conditions une augmentation de la masse protéique microsomale et mitochondriale ; l'inhibition n'est que de 33 à 39% par rapport au témoin. Lorsque la cycloheximide, à la même concentration de 0,28 $\mu\text{g/ml}$, est laissée dans le milieu de survie, l'inhibition est totale.

Existe-t-il un effet préférentiel de la cycloheximide sur les

TABLEAU XLII

Effets de la cycloheximide sur l'augmentation des protéines des fractions cellulaires pendant la survie.

Les valeurs sont les moyennes de trois déterminations. La survie dure 24 heures.

	Exp 1			Exp 2			Exp 3			C4
	F	S	C1	F	S	C2	F	S	C3	
MITOCHONDRIES										
mg prot.100g ⁻¹	3,6	7,0	4,8	5,36	10	5,6	2,7	4,0	3,0	3,5
augmentation (%)		93	37		86	3		49	13	30
inhibition de l'augmentation (%)			74,5			96			72	39
MICROSOMES										
mg prot.100g ⁻¹	54,8	78,8	62,0	41,7	58,6	32	40	51,9	32,2	47,9
augmentation (%)		43	13		40	-30	3	30	-15	20
inhibition de l'augmentation (%)			70			100			100	33
SURNAGEANT										
mg prot.100g ⁻¹	411,7	489,9	469	453	535	333	312	347	290	306
augmentation (%)		14	12		23	- 6		11	-14	0
inhibition de l'augmentation (%)			14			100			100	100

F = tissu frais ; S = tissu en survie ; C = tissu ayant subi le traitement de survie en présence de cycloheximide

C1 = concentration 0,14 µg/ml ; C2 = 0,56 µg/ml ; C3 = 0,28 µg/ml ; C4 = dans ce traitement, la cycloheximide est administrée à la concentration de 0,28 µg/ml pendant 6 heures, puis éliminée du milieu pendant les 18 heures suivantes.

synthèses protéiques microsomales ? Dans les expériences que nous venons de décrire, cet effet ne semble pas exister puisque l'inhibition touche également la synthèse des protéines mitochondriales. Aux concentrations de 0,28 $\mu\text{g/ml}$, la cycloheximide inhibe fortement l'augmentation de la teneur en protéines des culots microsomaux et inhibe moins intensément l'augmentation observée dans les culots mitochondriaux ; à plus forte concentration, toutes les fractions cellulaires sont inhibées à 100%. Nous n'avons jamais obtenu d'inhibition exclusive touchant les fractions microsomales et n'intervenant pas sur les fractions mitochondriales. Nous évoquerons plus loin cet intéressant résultat.

b) Chloramphénicol.

A la dose de 50 $\mu\text{g/ml}$, le chloramphénicol a une influence négligeable sur l'augmentation de la masse protéique des culots microsomaux et mitochondriaux pendant la survie (*Tableau XLIII*). Ce premier résultat montre l'action très faible de cet antibiotique sur l'augmentation de la masse protéique mitochondriale, à une dose qui, pourtant, d'après de nombreux travaux (ASHWELL et WORK, 1968), (LAMB et al., 1968), (ROUSLIN et SCHATZ, 1969) est suffisante pour inhiber *in vitro* les synthèses protéiques mitochondriales ; l'inhibition négligeable au niveau des microsomes est logique, sachant que le chloramphénicol a peu d'effet sur la synthèse ribosomale de type 80S.

Administré à la dose beaucoup plus élevée de 323 $\mu\text{g/ml}$ (1 mM) et laissé constamment dans le milieu de survie pendant 24 heures, le chloramphénicol inhibe de façon appréciable l'augmentation de la masse protéique à la fois dans les mitochondries et les microsomes.

Une technique intermédiaire, inspirée de ASAH I et MAJIMA (1969), consiste à placer les rondelles en contact du chloramphénicol à très forte concentration (2 mg/ml) pendant une heure, puis à transférer les rondelles en milieu de survie normal. On observe dans ces conditions un effet pratiquement nul, à la fois sur les augmentations des teneurs en protéines des culots mitochondriaux et microsomaux.

TABLEAU XLIII

Influence du chloramphénicol sur l'augmentation de la masse des protéines de diverses fractions cellulaires pendant la survie de tranches de tubercule de Pomme de terre.

	F	S	CAP ₁	F	S	CAP ₂	F	S	CAP ₃
MITOCHONDRIES									
mg	3,2	5,1	5,0	3,5	4,7	4,3	5,4	10	6
% augmentation		60	56		35	2,2		86	12
% inhibition de l'augmentation			6			37			86
MICROSOMES									
mg	38	52,8	52	40	55,6	53,5	41,7	58,6	43
% augmentation		39	37		39	34		41	3
% inhibition de l'augmentation			5			13			93
SURNAGEANT									
mg	274	280	290	312	347	330	411	489	463
% augmentation		2	6		11	6		19	13
% inhibition de l'augmentation			—			—			31

F = tissu frais ; S = tissu en survie ; CAP₁ = chloramphénicol à la concentration de 50 µg/ml ; CAP₂ = chloramphénicol à la concentration de 2 mg/ml ; CAP₃ = chloramphénicol à la concentration de 323 µg/ml.

c) Puromycine.

A la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$, la puromycine inhibe totalement l'augmentation de la teneur en protéines microsomales et mitochondriales.

3) Incorporation de la (^3H)-leucine dans les protéines.

Pour confirmer les résultats que nous venons d'obtenir en suivant les augmentations des masses protéiques, nous avons étudié l'effet des inhibiteurs sur l'incorporation de la (^3H)-leucine dans les fractions cellulaires.

a) Cycloheximide.

Comme le montre la figure 64, la cycloheximide à la concentration de 0,28 $\mu\text{g/ml}$ inhibe fortement l'exaltation (1250% d'augmentation) de l'incorporation de la leucine marquée dans les protéines mitochondriales ou microsomales. L'effet de la cycloheximide sur les biosynthèses de protéines confirme donc les renseignements donnés par les dosages protéiques.

b) Chloramphénicol.

Le chloramphénicol, à forte dose de 50 $\mu\text{g/ml}$, a une action négligeable sur l'incorporation de la (^3H)-leucine dans les protéines mitochondriales ou microsomales. Administré à la dose de 2 mg/ml pendant les premières heures de survie, il ne provoque qu'une faible inhibition de cette incorporation de leucine.

c) Puromycine.

On retrouve l'inhibition importante de la puromycine sur les synthèses protéiques.

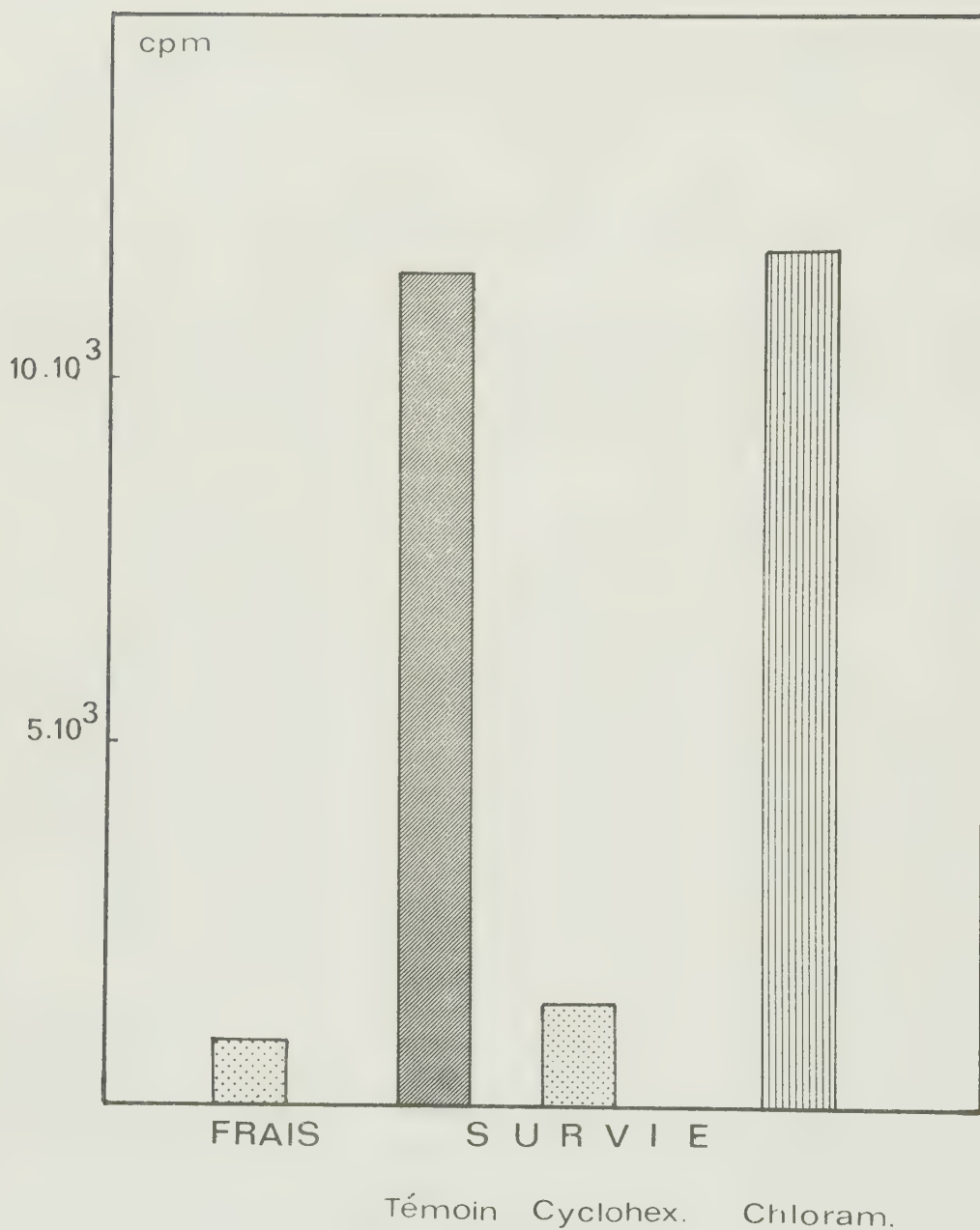


Fig. 64

Incorporation de (^3H)-leucine *in vivo* dans les microsomes de tranches fraîches, de tranches en survie en milieu normal (témoin), de tranches en survie en présence de cycloheximide (0.56 g/ml) ou de chloramphénicol (50 $\mu\text{g/ml}$). En ordonnée, est indiquée la radioactivité totale en cpm pour les fractions isolées de 10 g de matière fraîche.

4) Action des inhibiteurs sur la stimulation de la NADH-cytochrome c-réductase.

Nous avons montré que la survie provoquait une exaltation de l'activité NADH-cytochrome c-réductasique associée aux microsomes ou aux mitochondries. Il était intéressant de rechercher si cette stimulation dépendait de la synthèse de nouvelles protéines impliquées dans cette réaction enzymatique.

La cycloheximide ajoutée dans le milieu à la concentration de 0,56 µg/ml (ou même de 0,28 µg/ml) inhibe l'augmentation de l'activité de la NADH-cytochrome c-réductase, ce qui montre que cette stimulation dépend de la synthèse de nouvelles protéines ; cette inhibition est observée au niveau des microsomes (enzyme insensible à l'antimycine A) ou des mitochondries (enzyme sensible à l'antimycine A) (*Fig. 65*).

Par contre le chloramphénicol n'a aucun effet sur la stimulation de cette enzyme.

On peut rapprocher ce résultat des expériences de DALLNER et al. (1966b) qui suivent le développement de l'activité NADH-cytochrome c-réductasique dans le réticulum endoplasmique du fœtus et du Rat nouveau né ; l'injection de puromycine supprime la forte augmentation de l'activité enzymatique qui se manifeste pendant le développement du fœtus et du Rat nouveau né. Les auteurs concluent à une néosynthèse de protéines enzymatiques intervenant dans le réticulum endoplasmique. D'autre part, ASAHI et MAJIMA (1969) ont mis en évidence une inhibition du développement de la peroxydase mitochondriale en ajoutant de la cycloheximide dans le milieu de survie contenant les disques de Patate douce.

5) Action des inhibiteurs de la synthèse des protéines sur la stimulation des synthèses lipidiques.

Les expériences que nous venons de décrire ont précisé les conditions dans lesquelles l'induction de la synthèse de protéines nouvelles pouvait être provoquée. En nous plaçant exactement dans ces conditions, nous avons tenté d'apprécier les conséquences de la suppression de ces synthèses protéiques sur l'exaltation des synthèses lipidiques au cours de la survie.

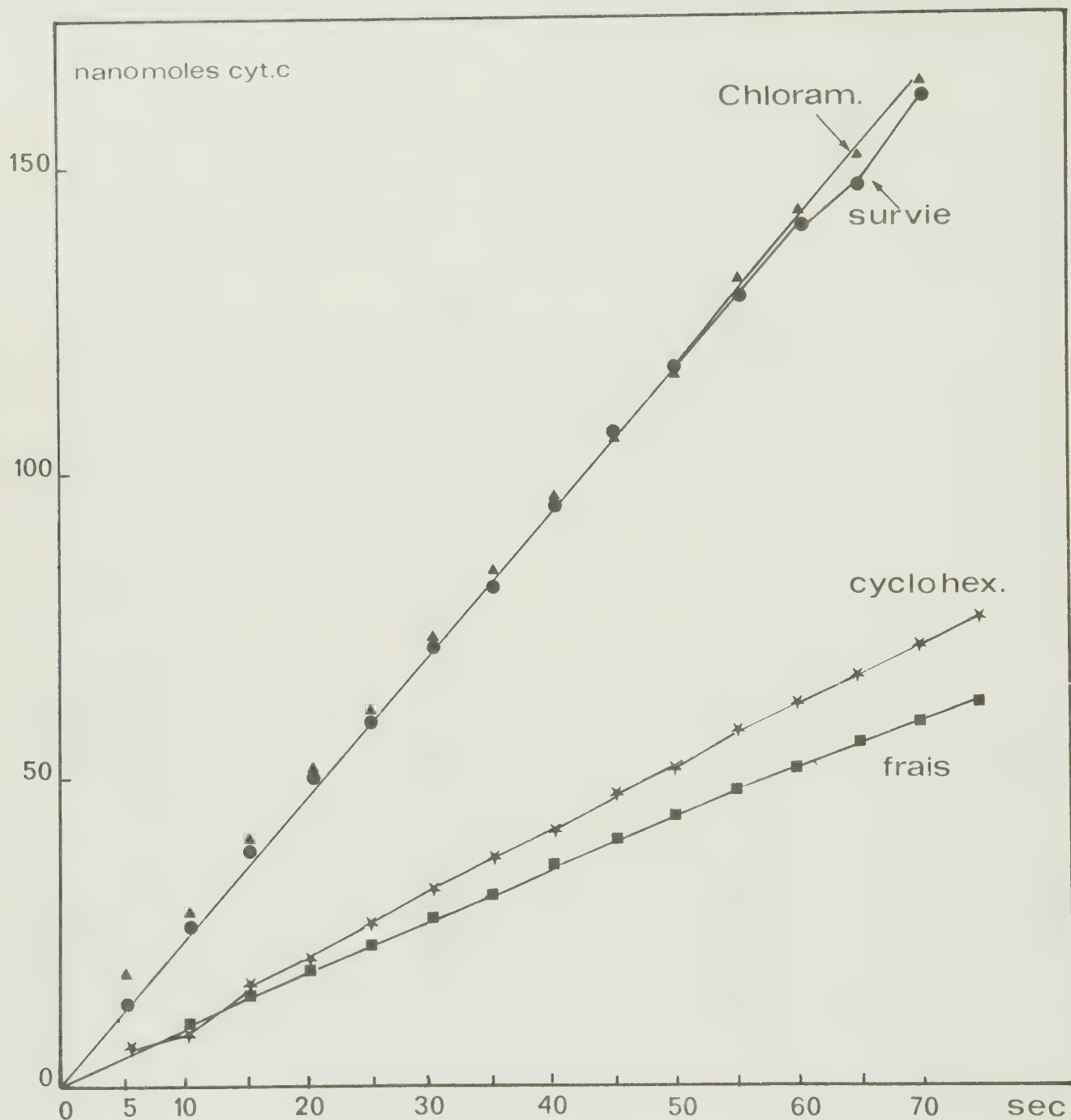


Fig. 5^e

Effets de la cycloheximide (cyclohex.) (0,56 $\mu\text{g/ml}$) et du chloramphénicol (chloram.) (50 $\mu\text{g/ml}$) sur la stimulation de l'activité de la NADH-cytochrome c réductase microsomale au cours de la survie.

En ordonnée, sont indiquées les quantités de cytochrome c réduit (en nanomoles) pour les fractions cellulaires isolées de 2,5 g de tissu.

Le temps de la réaction enzymatique est exprimé en secondes.

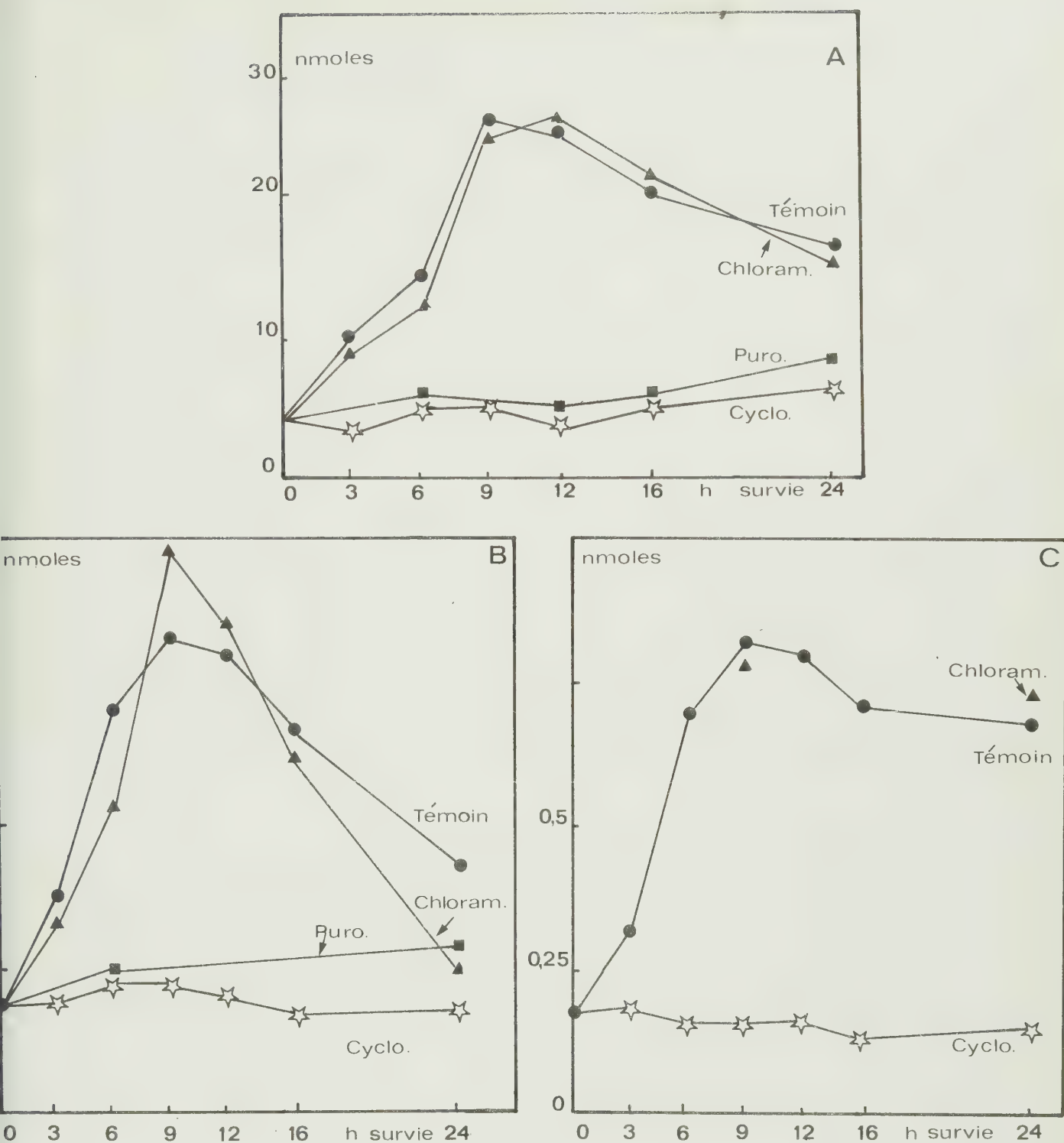


Fig. 66

Effets des inhibiteurs de la synthèse des protéines sur les stimulations de l'incorporation d'acétate marqué *in vivo* dans les lipides du tissu entier (A), les microsomes (B) et les mitochondries (C) au cours de la survie. Le chloramphénicol (Chloram.) est administré à la dose de 2 mg/ml pendant la première heure de survie. La cycloheximide (cyclo.) et la puromycine (Puro.) sont laissées constamment dans le milieu de survie à des doses respectivement égales à 0,56 μ g/ml et à 25 μ g/ml. Les quantités de précurseur incorporées dans les lipides sont exprimées en nanomoles pour 10 g de tissu.

TABLEAU XLIV

Influence de la cycloheximide et du chloramphénicol sur l'augmentation de la masse des phospholipides au cours de la survie.

	en μg phospholipides. 100 g^{-1} poids initial			
	Frais	Survie	Cyclohexi- mide (0,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Chloram- phénicol (2mg/ml)
MITOCHONDRIES	494	1.125	656	1.050
% augmentation		+128	+ 33	+ 11
% inhibition de l'augmentation			74	4
MICROSOMES	10.500	17.720	11.580	16.500
% augmentation		+ 68	+ 10	+ 57
% inhibition de l'augmentation			85	16
SURNAGEANT	796	1.260	1.020	1.100
% augmentation		+ 58	+ 28	+ 38
% inhibition de l'augmentation			51	34

a) Effet des antibiotiques sur l'augmentation de la masse des phospholipides et des acides gras.

La cycloheximide inhibe fortement l'augmentation de la teneur en phospholipides observée dans les culots microsomaux et mitochondriaux pendant la survie (Tableau XLIV). Elle inhibe également les biogénèses des lipides présents dans le surnageant.

Le chloramphénicol, par contre, a une action négligeable, même quand il est ajouté à la dose de 2 mg/ml pendant la première heure de survie.

b) Incorporation du (1-¹⁴C)-acétate dans les lipides du tissu entier.

La cycloheximide supprime totalement l'exaltation de l'incorporation de l'acétate dans les lipides du tissu entier après survie. La puromycine provoque aussi une inhibition pratiquement totale (Fig. 66). L'inhibition par la cycloheximide déjà signalée par WILLEMOT et STUMPF (1967b), dans les conditions où cet antibiotique supprime l'augmentation de la synthèse des protéines, indique le lien étroit entre les deux processus biosynthétiques.

On doit rappeler que, dans ces expériences, les techniques de marquage simultané à la (³H)-leucine et au (1-¹⁴C)-acétate permettent de suivre les phénomènes avec une précision élevée.

Signalons enfin que le chloramphénicol, à dose faible (50 µg/ml), n'affecte pas les synthèses lipidiques.

c) Biosynthèse des lipides liés aux microsomes ou aux mitochondries.

La cycloheximide (0,56 µg/ml) inhibe l'exaltation de l'incorporation de l'acétate dans les lipides totaux des culots microsomaux pendant la survie ; l'inhibition est totale, la radioactivité (après 24 heures en survie) étant même légèrement inférieure à celle observée dans le tissu frais (Fig. 66).

De même, l'effet de la cycloheximide est important sur les stimulations de l'incorporation de l'acétate marqué dans les lipides des mitochondries.

TABLEAU XLV

Influence de la cycloheximide sur la stimulation de l'incorporation de l'acétate radioactif in vivo dans les phospholipides des microsomes et des mitochondries provoquée par la survie.

		Fractions cellulaires isolées de		
		Tissu frais	Tissu en survie (12 h.)	Tissu en survie + cycloheximide (12 h.)
		% de radioactivité totale des phospholipides		
M I C R O S O M E S	PI	5,8	7,7	3,4
	PC	<u>37</u>	<u>40,2</u>	<u>36,8</u>
	PG	43,0	27,9	47,9
	PS	1	1,5	1,5
	PE	<u>8,1</u>	<u>18,1</u>	<u>6,5</u>
	DPG	1,6	1,0	2,0
	PA	2,1	2,5	1,1
M I T O C H O N D R I E S	PI	11,8	8,9	14,8
	PC	<u>36,9</u>	<u>41,3</u>	<u>39,2</u>
	PG	24,1	12,6	25,9
	PS	1,1	1,0	2,0
	PE	<u>11,8</u>	<u>25,3</u>	<u>12,6</u>
	DPG	2,3	3,9	2,3
	PA	4,6	2,5	3,2

La puromycine, comme la cycloheximide, inhibe cette stimulation des synthèses lipidiques.

Par contre, le chloramphénicol, à la concentration de 2 mg/ml (pendant 1 heure), n'inhibe pas, et même semble légèrement augmenter, la valeur du maximum de marquage ; cette légère augmentation significative a été obtenue plus de 5 fois.

L'effet de la cycloheximide est réversible. Lorsqu'on laisse la cycloheximide pendant les 6 premières heures de survie, puis qu'on transfère les tranches de tissu sur un milieu sans inhibiteur, on observe tout d'abord que, pendant les 6 premières heures, l'exaltation des synthèses des lipides est supprimée, puis, à partir de la 6ème heure, les synthèses augmentent fortement et atteignent une valeur comparable à celles obtenues avec le témoin. Tout se passe comme si les précurseurs des synthèses lipidiques s'étaient accumulés en raison de la présence de cycloheximide, puis une fois la cycloheximide dégradée, les synthèses ont pu être conduites normalement.

6) Effet des inhibiteurs sur la nature des lipides synthétisés.

Nous venons de décrire l'effet inhibiteur de la cycloheximide sur la stimulation de la biosynthèse des lipides et des acides gras totaux. Est-ce que les synthèses de tous les lipides sont inhibées de la même façon ? En particulier, y-a-t'il une inhibition de l'induction de la synthèse de l'acide *linoléique*, caractéristique de la survie ?

a) Synthèse des phospholipides individuels.

L'addition de la cycloheximide dans le milieu de survie inhibe l'exaltation du marquage des différents phospholipides, aussi bien dans les fractions mitochondries que dans les fractions microsomes. En particulier, on inhibe le marquage relatif plus important de la phosphatidyléthanolamine ; le pourcentage de radioactivité totale présent dans ce phospholipide (*Tableau XLV*) est de 8% dans les microsomes de tissu frais, 18% après survie de 24 heures et seulement 6,5% après survie en présence de

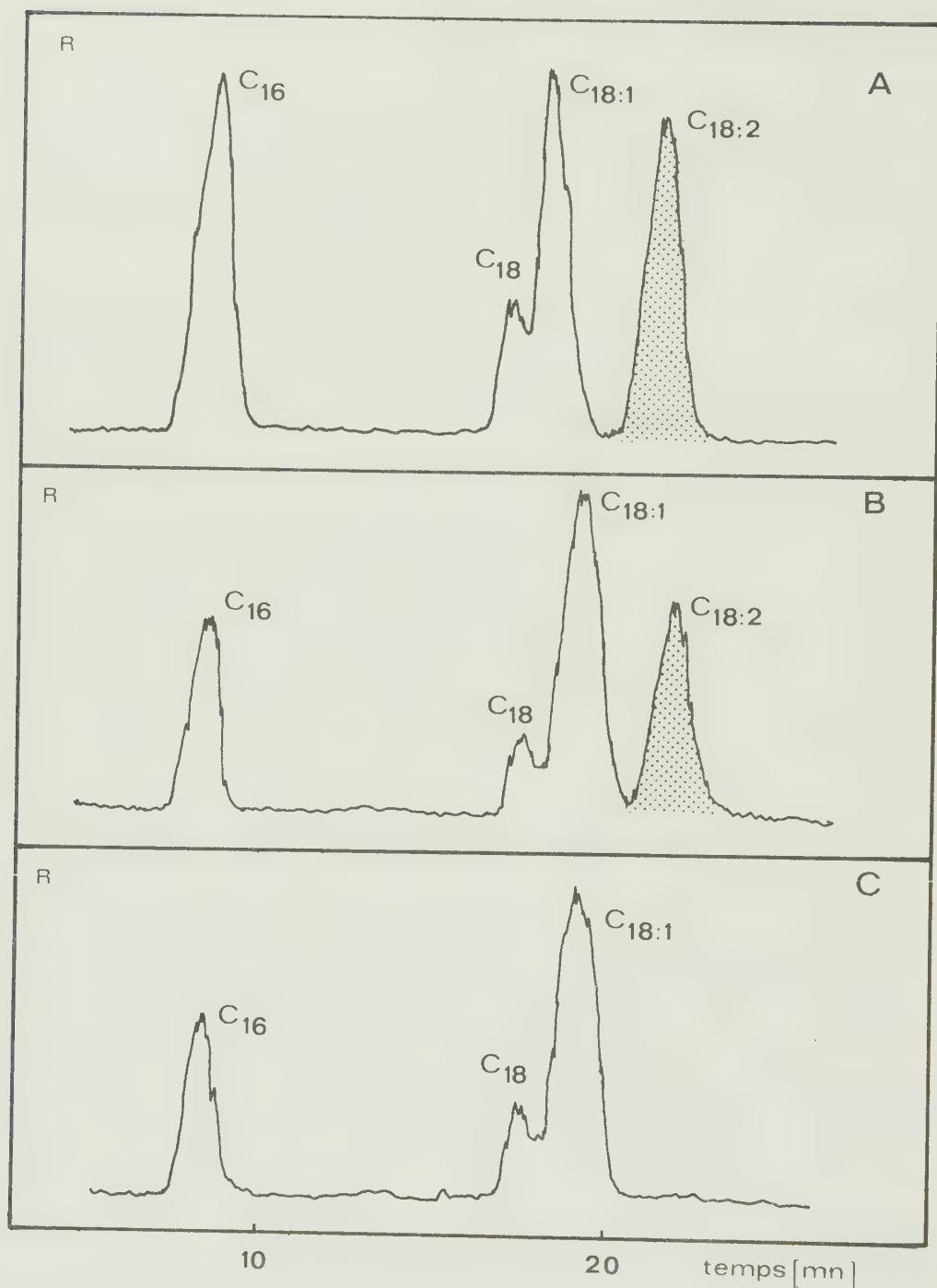


Fig. 67

Influence de la cycloheximide (0,56 $\mu\text{g/ml}$) (C) et du chloramphénicol (323 $\mu\text{g/ml}$) (B) sur l'exaltation de la biosynthèse de l'acide linoléique dans les microsomes au cours de la survie (A).
L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

cycloheximide. De même, la diminution du pourcentage de radioactivité totale du phosphatidylglycérol est supprimée. Le chloramphénicol, par contre, ne joue aucun rôle dans ces synthèses.

La cycloheximide supprime d'une façon nette l'induction de la synthèse de l'acide *linoléique* ; le pourcentage relatif de la radioactivité des acides gras totaux (*Fig. 67*) passe de 27,20% après survie à seulement 8,4% en présence de cycloheximide. Nous avons observé de nombreuses fois cette inhibition importante. La distribution de la radioactivité dans les acides gras des microsomes après survie en présence de cycloheximide est semblable à celle obtenue dans le tissu fraîchement coupé.

Le chloramphénicol à la dose de 50 µg/ml n'inhibe pas les synthèses et n'affecte pas les synthèses d'acide *linoléique*.

Nous avons voulu utiliser des doses plus fortes pour obtenir un effet inhibiteur : à la concentration forte de 323 µg/ml, le chloramphénicol étant laissé constamment dans le milieu de survie, on observe effectivement une diminution de la radioactivité des acides totaux. Cette décroissance pourrait être due à l'effet qu'exerce l'inhibiteur à forte dose sur le système cytoplasmique ribosomal. Il est cependant important de noter que, dans ces conditions, le pourcentage de radioactivité totale présent dans l'acide *linoléique* reste inchangé. Nous avons seulement agi sur le niveau général des synthèses.

Ce résultat montre, à notre avis, l'action différente du chloramphénicol et de la cycloheximide. Ce dernier antibiotique interdit toute induction des désaturases permettant la synthèse d'acide *linoléique*. Par contre, le chloramphénicol laisse une certaine intensité biosynthétique qui, même réduite, se produit normalement ; cette action du chloramphénicol pourrait s'expliquer par un contrôle moins strict de la formation de nouveaux ribosomes.

Précisons enfin que l'effet de la cycloheximide sur la synthèse de l'acide *linoléique* est réversible : quand on transfère des rondelles préalablement traitées par cet inhibiteur dans un milieu sans cycloheximide, les synthèses sont restaurées.

TABLEAU XLVI

Induction de l'oléyl-coenzyme A désaturase pendant la survie des tranches de tubercule et effets d'inhibiteurs des synthèses protéiques et d'acides nucléiques sur cette induction.

Microsomes isolés de 10 g de tissu (matière fraîche initiale)	% de désaturation	Nanomoles de linoléate synthétisées en une heure à partir de 2,6 nanomoles de précurseur
<u>Tranches fraîches</u>	0	0
<u>Tranches en survie</u> pendant 16 heures dans les conditions suivantes :		
à + 25°C	42,5	1,1
à + 2°C	15,6	0,40
à + 25°C en présence de cycloheximide (1 µg/ml) dans le milieu de survie	0	0
à + 25°C en présence de chloramphénicol (100 µg/ml) dans le milieu de survie	56,6	1,46
à + 25°C en présence d'actinomycine D (100 µg/ml) dans le milieu de survie	16,7	0,43

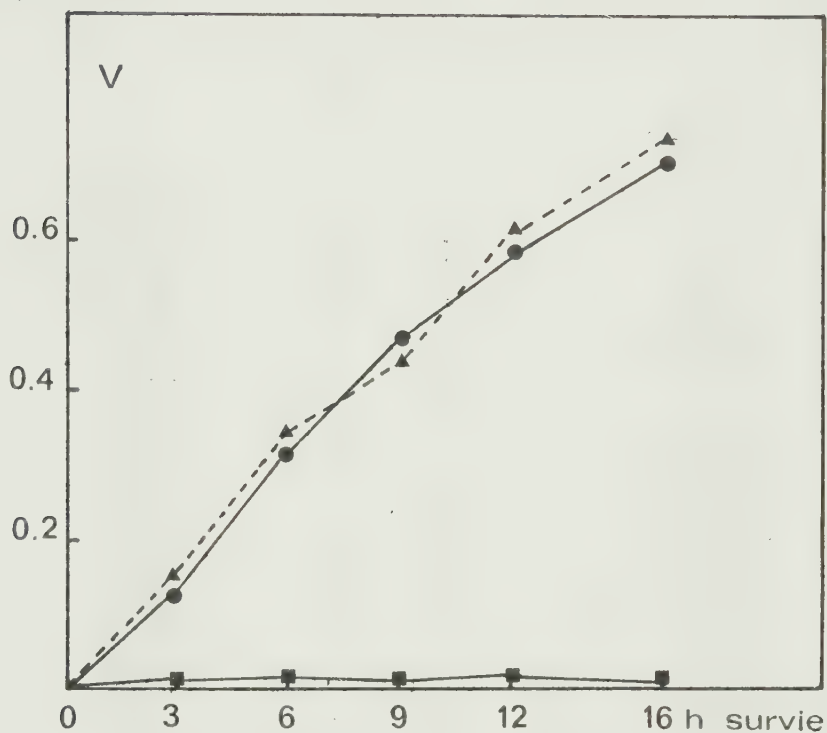


Fig. 68

Induction de l'oléyl-coenzyme A désaturase au cours de la survie. Effets de la cycloheximide et du chloramphénicol sur cette induction.

La survie est effectuée en milieu normal ●—●, en présence de cycloheximide (1 µg/ml) ■—■, ou de chloramphénicol (50 µg/ml) ▲—▲. Les tranches (10 g) sont prélevées à intervalles réguliers, les microsomes en sont isolés et les essais enzymatiques sont effectués sur la totalité du culot. La vitesse (V) est exprimée en nanomoles de linoléate synthétisé par heure et pour les culots isolés de 10 g de tissu.

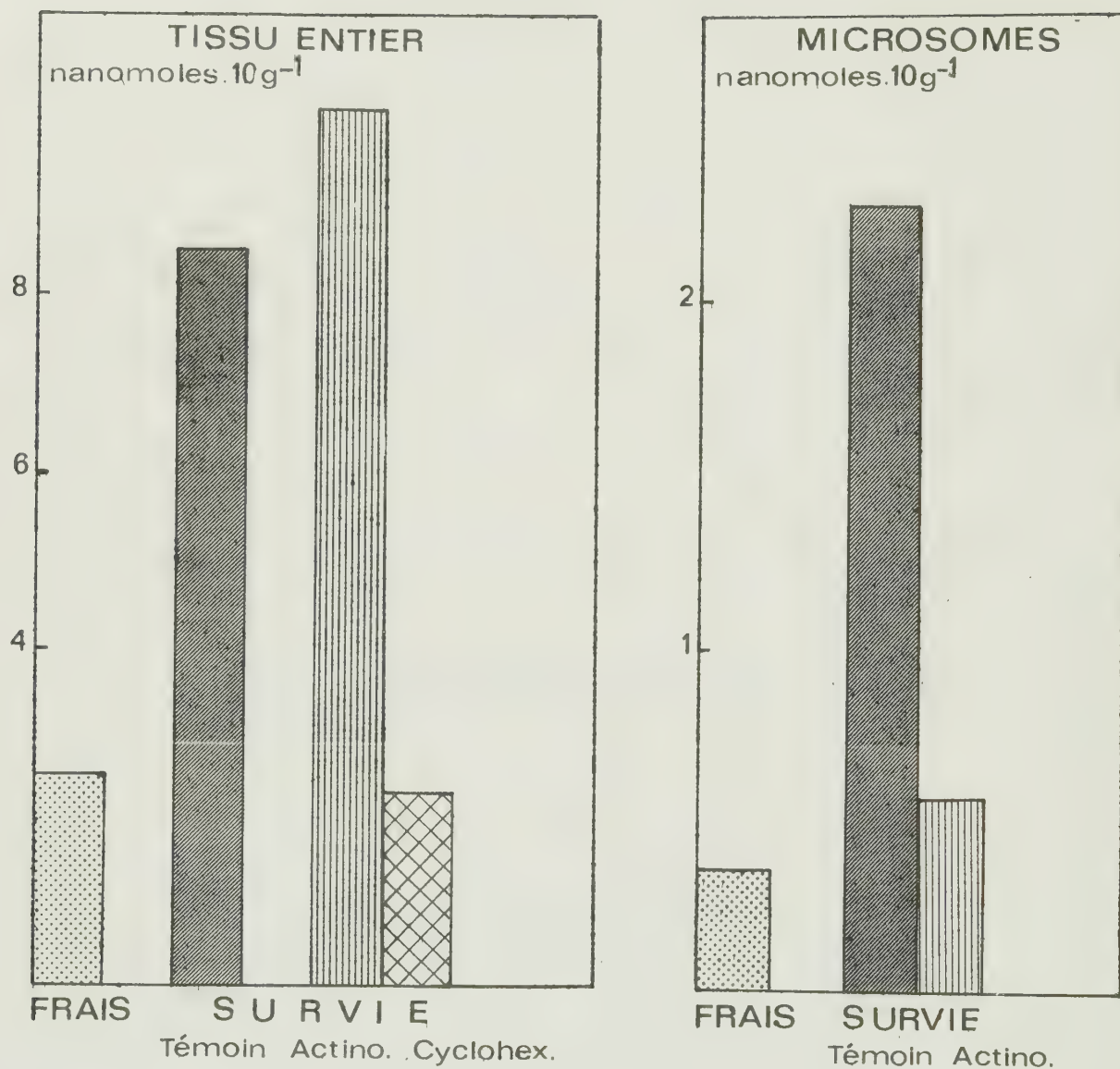


Fig. 70

Effets de l'actinomycine D sur la biosynthèse *in vivo* de lipides dans les tranches en survie. L'incorporation d'acétate marqué est exprimée en nanomoles par 10 g de matière fraîche (tissu entier) ou en nanomoles pour la totalité du croquet microsomal isolé de 10 g de matière fraîche. Les concentrations utilisées sont de 25 µg/ml pour l'actinomycine D (actino.) et de 1 µg/ml pour la cycloheximide (cyclohex.).

7) Effet des inhibiteurs sur l'induction de l'oléyl-Coenzyme A désaturase microsomale.

L'addition de cycloheximide à des doses variant entre 0,28 µg/ml et 2 µg/ml supprime l'induction de l'activité oléyl-Coenzyme A désaturasique associée aux microsomes isolés de tranches en survie (Fig. 68) (Tableau XLVI). Le pourcentage de désaturation reste constamment nul tout au long de la survie. Ceci concorde tout à fait avec le résultat des expériences *in vivo*.

Par contre, le chloramphénicol à la concentration de 50 µg/ml ne diminue pas la désaturation ; au contraire une légère stimulation, significative et reproductible, s'observe, relative probablement aux perturbations entraînées par l'inhibiteur au niveau des synthèses d'ARN ribosomiques.

Cette action sélective de la cycloheximide et du chloramphénicol est en plein accord avec la conception d'une oléyl-Coenzyme A-désaturase localisée dans les membranes microsomales et dont l'induction au cours de la survie est indispensable à la synthèse de l'acide *linoléique*.

B - EFFETS DES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLEIQUES.
=====

Nous venons de montrer que l'exaltation des synthèses des lipides nécessite l'élaboration de nouvelles protéines ; il était intéressant de rechercher si cette synthèse de protéines et de lipides dépendait d'une synthèse d'ARN. Nous avons donc conduit quelques expériences en utilisant l'actinomycine D, qui inhibe les transcriptions du message génétique de l'ADN vers l'ARN.

1) Modifications ultrastructurales (Fig. 69).

On peut observer une pulvérisation du nucléole en petits fragments ; cet effet de l'actinomycine D a déjà été observé par LORCH et JEON (1969) et GOLDBLATT et al., (1970) dans les tissus animaux. Etant donné que l'on connaît le rôle important que joue le nucléole dans les synthèses d'ARN, on peut être convaincu que l'actinomycine D dans nos conditions d'expériences a effectivement joué son rôle d'inhibiteur.

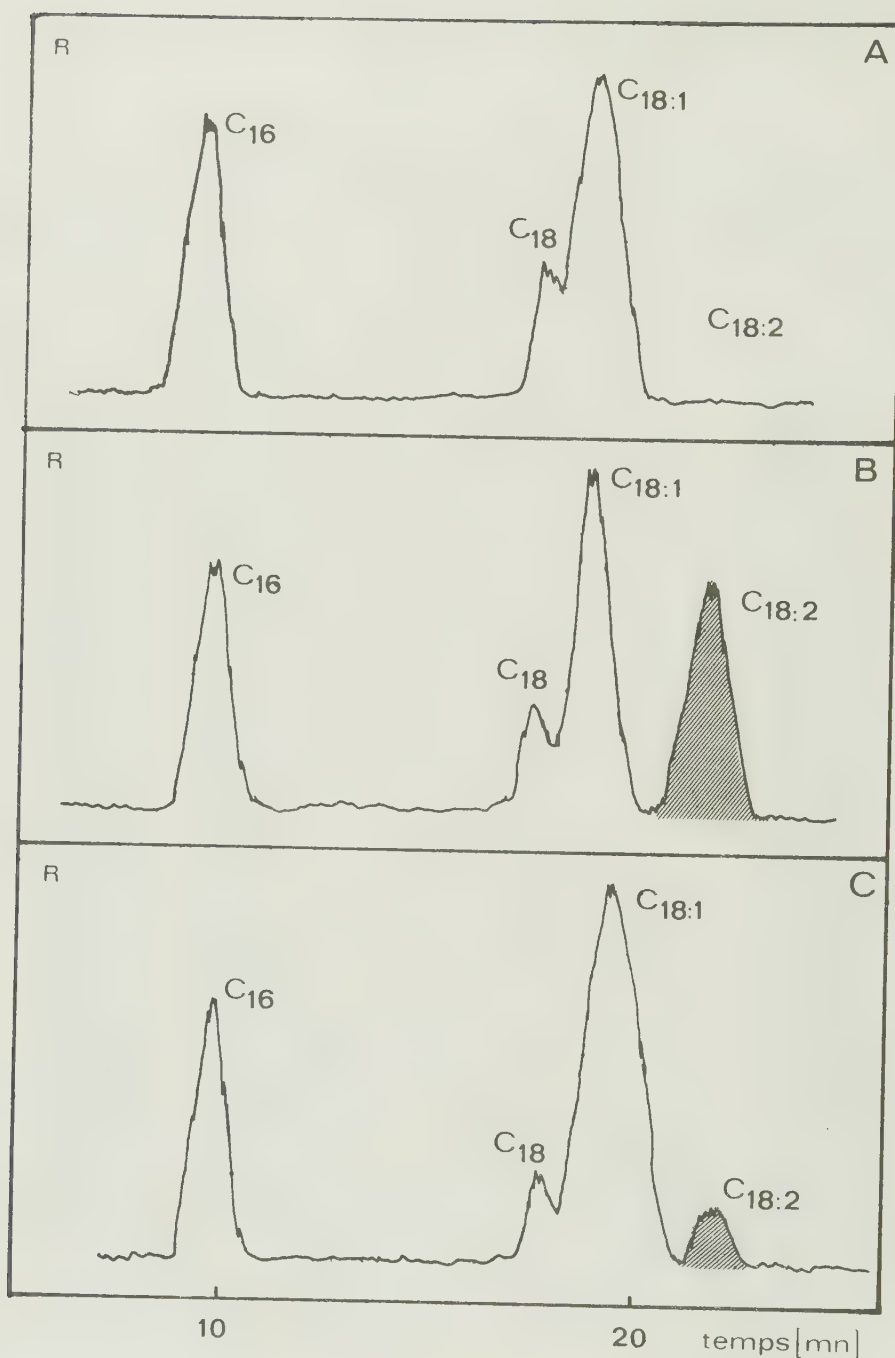


Fig. 71

Influence de l'actinomycine D sur la biosynthèse in vivo de l'acide linoléique au cours de la survie.

En A : microsomes isolés de tissu frais

En B : microsomes isolés de tissu en survie en milieu normal

En C : microsomes isolés de tissu en survie en milieu contenant de l'actinomycine D (25 µg/ml)

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

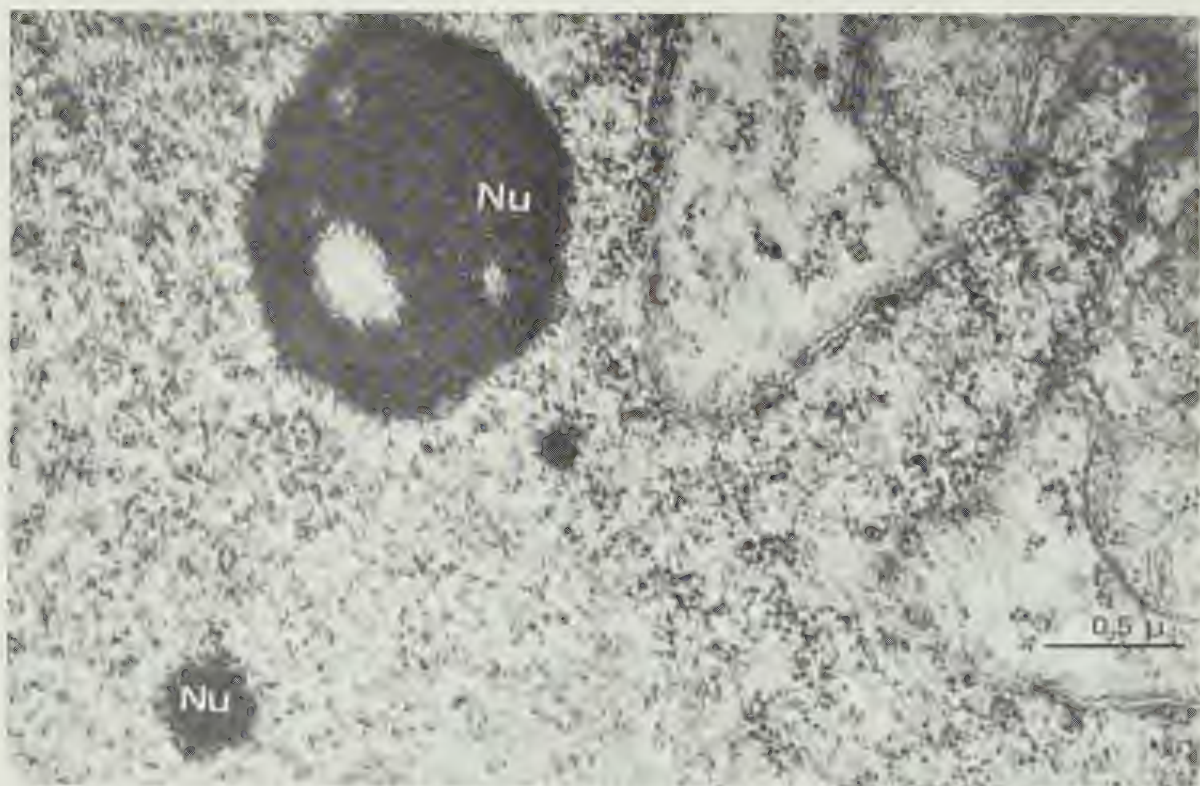
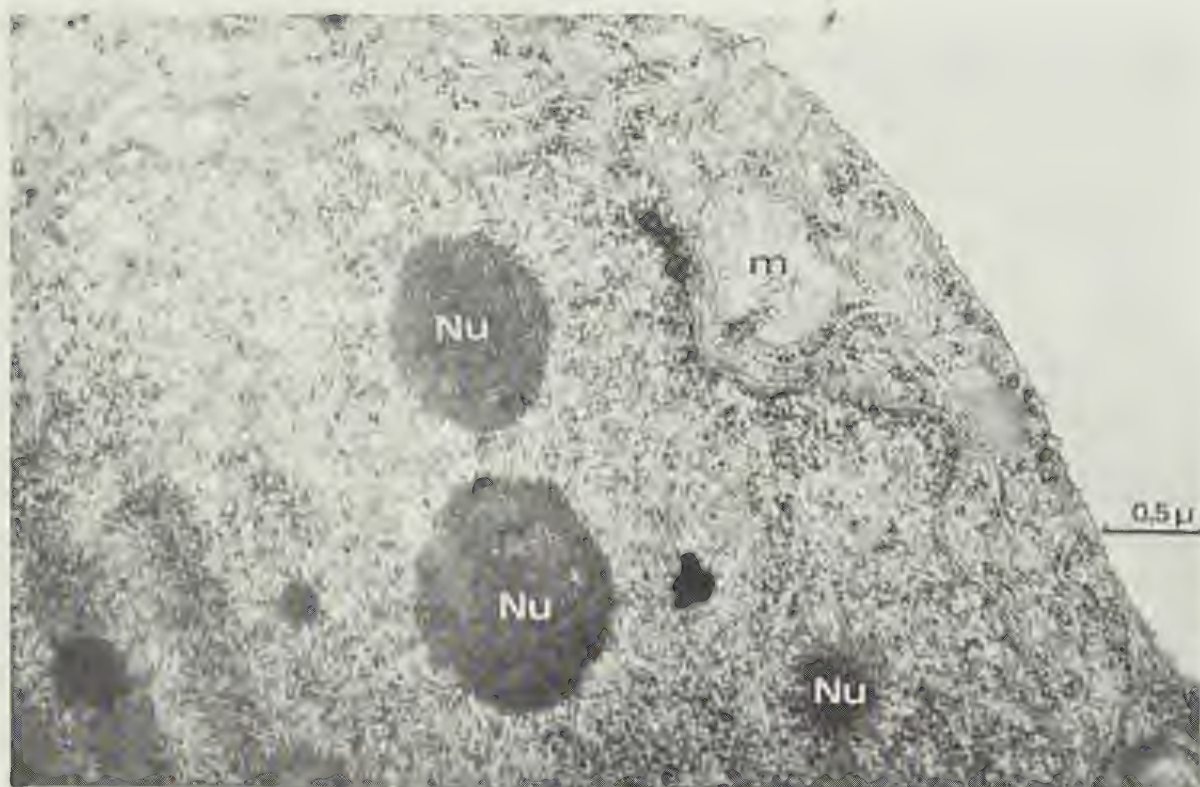


Fig. 69. Effets de l'actinomycine D sur les modifications ultrastructurales induites au cours de la survie. On observe la fragmentation du nucléole (Nu) en petites sphères.

2) Action de l'actinomycine D sur les synthèses lipidiques.

L'actinomycine D n'inhibe pas la stimulation de la biosynthèse des lipides observée dans le tissu entier au cours de la survie. Ce résultat est confirmé par plusieurs expériences. WILLEMOT et STUMPF (1967b) (Fig. 70) avaient noté des résultats variant selon les expériences, mais ils avaient déjà signalé que l'actinomycine D n'inhibait pas totalement la stimulation de la biosynthèse des lipides.

Est-ce que cette absence d'effet de l'actinomycine D est due à une dose trop faible par exemple ? Nous pouvons écarter cette hypothèse puisque les micrographies électroniques examinées au paragraphe précédent ont montré que l'actinomycine D avait effectivement agi sur la structure des nucléoles.

L'actinomycine D, si elle n'inhibe pas la stimulation de la biosynthèse des acides gras saturés et monoinsaturés, supprime totalement l'induction de la biosynthèse de l'acide *linoléique* (Fig. 71). Ce résultat, inattendu, n'avait jamais été signalé auparavant. Une telle inhibition sélective de l'actinomycine D, concernant uniquement la synthèse de l'acide gras majeur et permettant aux autres acides gras d'être synthétisés normalement, peut être interprétée en supposant une inhibition sélective des informations nécessaires à la biosynthèse des enzymes catalysant la production d'acide *linoléique*. Nous évoquerons à nouveau ce phénomène dans la discussion générale.

L'actinomycine D a donc une action inhibitrice nette au niveau de l'accumulation des lipides néoformés dans les microsomes. L'inhibition est aussi forte que celle exercée par la cycloheximide. L'acide *linoléique* n'est pratiquement pas synthétisé dans ces conditions. Il est intéressant de signaler que, au niveau des microsomes, nous ne retrouvons pas la stimulation de la synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés notée dans le tissu entier.

Cette action inhibitrice *in vivo* de l'actinomycine D a été retrouvée *in vitro* ; en effet, l'induction de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase au cours de la survie est fortement inhibée si l'on ajoute cet inhibiteur au milieu de survie (Tableau XLVI). Nous observons ainsi une inhibition active de la désaturase responsable de l'acide *linoléique*. Signalons cependant qu'une activité désaturasique non négligeable subsiste dans ces conditions.

C - DISCUSSIONS.

=====

Les résultats obtenus après action des antibiotiques sur les tissus en survie nous permettent de dégager trois séries de conclusions.

1) Les phénomènes liés à la survie dépendent d'une protéosynthèse.

Tous les résultats obtenus montrent nettement que le blocage de la synthèse de protéines empêche le développement de l'exaltation des synthèses lipidiques. Ce blocage de la synthèse des protéines inhibe en particulier la biogénèse de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase, indispensable à la synthèse de l'acide *linoléique*.

Cycloheximide.

La cycloheximide inhibe totalement l'augmentation de la teneur en protéines, en phospholipides et en acides gras des culots microsomaux et mitochondriaux. L'exaltation de l'incorporation de leucine radioactive est sévèrement touchée. Parallèlement, la stimulation des synthèses lipidiques après incorporation *in vivo*, en présence d'acétate, est totalement inhibée ; le niveau des synthèses reste analogue à celui des disques fraîchement coupés. Les caractéristiques mêmes de ces synthèses sont modifiées : il n'y a plus d'augmentation de la synthèse de phosphatidyléthanolamine, et surtout il n'y a plus d'induction de la synthèse d'acide *linoléique* et de la désaturation de l'oléyl-Coenzyme A ; ces résultats qualitatifs sont nouveaux ; en effet, WILLEMOT et STUMPF (1967b) ont étudié l'action de la cycloheximide sur les synthèses globales dans le tissu entier. Tous les phénomènes sont bloqués ; la tranche en survie dans l'inhibiteur est "figée" en quelque sorte à l'état initial.

Cet effet de l'inhibiteur n'est pas un effet toxique ; c'est un effet réversible. Il est facile en effet d'annuler tous les effets inhibiteurs de la cycloheximide. Il suffit pour cela de transférer les tranches de tissu après traitement de quelques heures en présence de cycloheximide, dans un milieu de survie sans inhibiteur : toutes les synthèses reprennent, à une vitesse accélérée, comme si les précurseurs de ces synthèses s'étaient accumulés.

Notons au passage que tous les phénomènes classiquement liés à la

survie ne se sont pas manifestés pendant le maintien des tranches en présence de cycloheximide, alors que toutes les conditions (coupe, aération, etc...) sont les mêmes par ailleurs. Ceci montre clairement que, si le traumatisme initial est nécessaire, l'apparition des événements ultérieurs de la survie dépend d'une activité métabolique intense de la cellule, créant *de novo* ses propres constituants.

Cet effet de la cycloheximide a été signalé au niveau du tissu entier de tubercule de Pomme de terre par WILLEMOT et STUMPF (1967b) et correspond bien à d'autres expériences réalisées sur les végétaux. Ainsi la cycloheximide est un inhibiteur effectif de la synthèse protéique chez les végétaux (FORD et al., 1958) ; son effet inhibiteur a été montré, *in vivo*, à des concentrations analogues à celles que nous avons utilisées (0,5 à 10 µg/ml) dans les feuilles de Tabac (PARISH, 1968), des disques de Pomme (GALLIARD et al., 1968), des germinations de Coton (WATERS et DURE, 1966) et, *in vitro*, dans les fractions microsomales de Betterave (ELLIS et MAC DONALD, 1968), de cotylédons de Pois (JACHYMCZYK et CHERRY, 1968), d'épicotyle de Pois (DAVIES et MAC LACHLAN, 1969). La cycloheximide, par son action sur la synthèse protéique, bloque la division des cellules végétales : Oignon (HADDER et WILSON, 1958), tubercule de Topinambour (ROSE, 1970), *Euglena gracilis* (BISHOP et SMILLIE, 1970), *Chlamydomonas* (EYTAN et OHAD, 1970).

CARLIER et al. (1972) viennent récemment de montrer que la cycloheximide inhibe l'augmentation de l'aptitude à absorber le glucose, provoquée par la survie de disques de *Pelargonium zonale*.

Un effet supplémentaire de la cycloheximide a été récemment observé par MAC DONALD et ELLIS (1969), ELLIS et MAC DONALD (1970) qui ont étudié l'effet de la cycloheximide sur des disques d'organes de réserve préalablement maintenus en survie ; la cycloheximide stimule de 42% la respiration de disques de Betterave, de 13% celle des tranches de Pomme de terre. D'après ces auteurs, la cycloheximide aurait un effet supplémentaire sur le métabolisme énergétique cellulaire ; cependant KIRK (1970) ne retrouve pas cette action de la cycloheximide dans des cellules d'*Euglène*. D'autre part, APREES et BRYANT (1971) n'ont pu confirmer les résultats d'ELLIS et MAC DONALD (1970) : la cycloheximide ne stimulerait pas la respiration des tranches de Carotte en survie et son premier effet serait d'inhiber les synthèses protéiques. Si les expériences d'ELLIS et MAC DONALD (1970) ont eu le mérite d'attirer l'attention des chercheurs sur une utilisation inconsidérée d'inhibiteurs comme la cycloheximide, elles ne mettent pas en question les résultats

de nos propres expériences qui ont été menées en prenant les précautions nécessaires, en n'utilisant pas de doses trop élevées (0,28 à 0,56 µg/ml), en vérifiant que l'inhibiteur ne provoquait pas le phénomène de stimulation de l'intensité respiratoire observé par ELLIS et MAC DONALD (1970) sur les tranches de Betterave et en procédant aux examens morphologiques.

Puromycine.

Cet inhibiteur stoppe fortement les stimulations des biosynthèses protéiques et lipidiques au cours de la survie.

On a retrouvé cet effet inhibiteur de la puromycine sur la synthèse protéique de nombreux tissus végétaux (approche *in vivo*) : disques de Betterave (MAC DONALD et al., 1966), tranches de feuilles de Tabac (PARISH, 1968), Betterave (VAUGHAN et MAC DONALD, 1967), Pomme (RHODES et al., 1968), Pomme de terre (CLICK et HACKETT, 1963 ; SAMPSON et LATIES, 1968), à des concentrations finales variant de 25 à 100 µg/ml. Son effet *in vitro* a été retrouvé dans des fractions microsomales de disques de Betterave (ELLIS et MAC DONALD, 1968).

L'action de la puromycine - qui n'exerce pas d'effets sur le métabolisme énergétique cellulaire - confirme pleinement les données obtenues grâce à la cycloheximide.

Chloramphénicol.

Cet inhibiteur, administré à une dose faible (50 µg/ml) ou à dose élevée pendant la première heure de survie (2 mg/ml), a un effet négligeable sur les synthèses protéiques et lipidiques. Ceci confirme l'intérêt de l'utilisation de la faible dose de chloramphénicol pour conduire les expériences dans un milieu où ne peuvent se développer de populations bactériennes.

L'absence d'effet inhibiteur du chloramphénicol ne peut être attribuée à sa non pénétration à l'intérieur du tissu : SCHLENDER et al. (1969), MARGULIES et BRUBAKER (1970) ont mis en évidence l'entrée importante et rapide du chloramphénicol dans les tissus végétaux (coléoptile d'Avoine ou feuilles de Haricot) ; on peut supposer qu'il en est de même dans les tissus de tubercule de Pomme de terre.

L'inhibiteur, entrant pourtant dans les cellules du tubercule, n'intervient pas sur les synthèses protéiques et lipidiques microsomales. Ce résultat s'accorde bien avec les données *in vitro*, montrant que le chloramphénicol ne joue aucun rôle sur les synthèses protéiques cytoplasmiques. Dans nos expériences, l'inhibiteur ne supprime pas les synthèses

protéiques mitochondriales : nous évoquerons par la suite ce résultat intéressant.

Nous avons dit, dans notre introduction, que le chloramphénicol pouvait effectivement inhiber la synthèse protéique *in vivo* quand il est administré à forte dose (300 à 700 µg/ml) : nous retrouvons effectivement une inhibition de l'exaltation des synthèses protéiques et lipidiques à la dose de 323 µg/ml (maintien constant du chloramphénicol pendant la survie) ; nous avons déjà signalé que l'inhibition touchait tous les acides gras, et non uniquement l'acide *linoléique*. Il s'agit plutôt d'une diminution du niveau des synthèses et non d'une inhibition relative de la synthèse d'acide *linoléique*. L'effet observé est très différent de celui de la cycloheximide ; signalons que JULIEN (1971) a montré que le chloramphénicol réduit la formation des ribosomes.

2) Les différents compartiments cellulaires jouent des rôles différents dans la formation des constituants membranaires.

Nous avons indiqué plus haut que la cycloheximide agissait, *in vitro*, uniquement sur les ribosomes 80S (trouvés dans le cytoplasme des cellules végétales), alors que le chloramphénicol agissait, *in vitro*, seulement sur les ribosomes 70S (que l'on trouve dans les mitochondries). De l'emploi de ces deux inhibiteurs, on pouvait espérer, dans une cellule végétale donnée, faire une discrimination entre les synthèses effectuées dans les mitochondries (type 70S) ou les "microsomes" porteurs des ribosomes 80S. Les résultats que nous avons obtenus dans les tranches de tubercule de Pomme de terre indiquent que les effets observés *in vivo* sont différents.

En effet la cycloheximide inhibe l'exaltation des synthèses protéiques et lipidiques dans le compartiment microsomal (ce qui est logique), mais aussi dans le compartiment mitochondrial (ce résultat surprenant a été confirmé de nombreuses fois). Cette action de la cycloheximide sur les mitochondries peut s'expliquer de deux façons :

1) on peut supposer que la cycloheximide, *in vivo*, exerce une action inhibitrice sur la synthèse protéique mitochondriale (cette inhibition ne serait pas observée *in vitro*). Cette interprétation ne peut recueillir aucun argument expérimental en sa faveur (*Fig. 72*).

Sensible à la
Cycloheximide

SYSTEME CYTOPLASMIQUE (EXTRA-MITOCHONDRIAL)

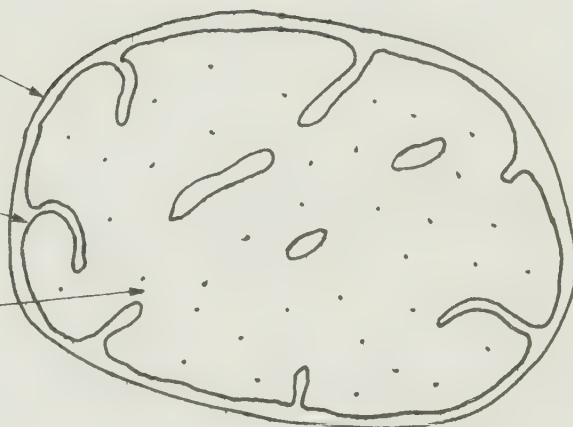
Transfert

Synthèse apocytochrome c
(KADENBACH, 1968, 1970)
Synthèse apocytochrome oxydase
(TUPPY et BIRKMAYER, 1969)
(BEATTIE et al., 1970)

membrane
externe

membrane
interne

matrix



Résistant à la
Cycloheximide

SYSTEME MITOCHONDRIAL

Synthèse de la partie hème du
cytochrome c
Synthèse de la partie hème de
la cytochrome oxydase
Synthèse de protéines insolubles
(BEATTIE et al, 1970 ; NEUPERT
et LUDWIG, 1971)

Fig. 72

Rappels sur les biosynthèses protéiques mitochondriales et extra-mitochondriales mises en évidence dans les mitochondries animales ou dans les mitochondries de levure. La mitochondrie nécessite une coopération avec d'autres compartiments cellulaires pour obtenir des cytochromes fonctionnels.

2) un échange de lipides et de protéines s'effectuerait entre les microsomes et les mitochondries : l'effet de la cycloheximide sur les microsomes se répercuterait donc sur les mitochondries.

Cette deuxième hypothèse est plus vraisemblable parce qu'elle s'accorde avec les nombreuses données obtenues :

- des échanges de phospholipides existent entre mitochondries et microsomes, *in vivo* et *in vitro*, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent
- les capacités de synthèse lipidique par les mitochondries isolées sont réduites. En particulier l'activité oléyl-Coenzyme A-désaturasique est localisée exclusivement dans les microsomes.

Une telle interprétation a été faite par quelques auteurs travaillant sur des tissus animaux (*Fig. 72*) ou sur la levure (ASHWELL et WORK, 1968, 1970), (LAMB et al., 1968), (ROUSLIN et SCHATZ, 1969), (CLARK-WALKER et LINNANE, 1966).

Les interprétations concernant les synthèses protéiques sont valables pour les synthèses lipidiques. L'action de la cycloheximide sur les incorporation de ^{32}P dans les phospholipides des mitochondries du foie de Rat (BEATTIE, 1969) s'explique par l'existence de ces échanges de lipides.

La même approche que celle que nous avons suivie (action des inhibiteurs pendant l'induction de la biogénèse membranaire) a permis à SAKANO et ASAHII (1971b) de montrer que, dans les tissus de Patate douce, la cycloheximide inhibait les augmentations de teneur en protéines, les incorporations de leucine marquée et l'activation de la cytochrome oxydase dans les culots mitochondriaux pendant la survie des tranches de tissu. Ils en concluent, comme nous, que la synthèse protéique mitochondriale intrinsèque est très faible et que des échanges de protéines sont nécessaires.

De même s'explique l'effet de la cycloheximide sur la stimulation de l'activité NADH-cytochrome c-réductasique mitochondriale sensible à l'antimycine. Les travaux de CLARK et LINNANE (1967) sur des souches de levure ayant poussé en présence de chloramphénicol, ou sur des mutants, ont montré que de nombreuses enzymes étaient apportées de l'extérieur (malate-déshydrogénase, fumarase, NADH-cytochrome c-réductase) (BORST et al., 1967).

Selon les hypothèses que nous venons de décrire, l'action du chloramphénicol s'explique : cet inhibiteur ne peut pas agir sur les synthèses protéiques et lipidiques microsomales à faible dose, les perturbations observées à forte dose n'ayant plus la spécificité nécessaire ; de ce fait, il n'empêche pas l'arrivée des lipides et protéines dans les membranes mito-

chondriales. Ainsi peut-on comprendre l'absence d'effet inhibiteur dans les mitochondries constamment alimentées en constituants biochimiques synthétisés par ailleurs.

L'utilisation des inhibiteurs de synthèse protéique comme révélateurs des localisations des systèmes de biosynthèses protéiques et lipidiques. confirme donc l'existence d'échanges de lipides et de protéines entre microsomes et mitochondries. Nous avons retrouvé une fois de plus l'importance du compartiment microsomal dans les synthèses de lipides et d'acides gras.

3) *La survie entraîne la dérégulation de multiples potentialités génétiques.* L'actinomycine D est l'inhibiteur qui a donné à ce point de vue les résultats les plus surprenants. Cet antibiotique inhibe - au niveau du tissu entier - spécifiquement la synthèse de l'acide *linoléique* à partir d'(1-¹⁴C)-acétate, tout en laissant la stimulation de la synthèse des autres acides gras se développer ; d'autre part, l'induction de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase est inhibée. La distribution de la radioactivité parmi les différents acides gras est donc la même dans les tissus en survie normale, en survie en présence d'actinomycine D et dans les tissus frais (et aussi dans les tissus en survie en présence de cycloheximide), mais les intensités des synthèses sont beaucoup plus élevées en présence d'actinomycine D.

Cette observation originale est très intéressante. L'actinomycine D empêche la synthèse de tout ARN messenger nouveau, mais serait sans action sur des ARN messagers préformés ; or de telles molécules informatives ont été découvertes par JULIEN (1971) dans les graines de Radis en imbibition ; la graine contiendrait des ARN messagers préformés, synthétisés avant l'entrée en dormance de la graine et qui seraient "démasqués" dès les premières heures d'imbibition. Si un tel phénomène se produit dans les tranches de tissu en survie, on peut ainsi comprendre pourquoi l'actinomycine D ne joue aucun rôle sur la stimulation de la synthèse de certains acides gras. Par contre, si des ARN messagers nouveaux doivent être synthétisés pour réaliser la synthèse de l'acide *linoléique*, l'actinomycine D peut jouer son rôle inhibiteur.

Un argument en faveur de cette hypothèse est le fait que les acides gras saturés et monoinsaturés sont effectivement synthétisés dans les tranches de tissu frais *avant toute survie*, tandis que la synthèse de l'acide *linoléique* se développe au cours de la survie. On ne peut s'empêcher de penser que ces différents acides gras marqués représentent des pools métaboliques à vocation bien différente, "énergétique" d'une part,

et "structurale" de l'autre, par exemple.

Les données recueillies suggèrent que la régulation génétique des synthèses d'acides gras se présenterait ainsi dans nos tranches de tissu :

- la cycloheximide empêcherait la synthèse de toutes les protéines indispensables à l'élaboration des différentes catégories d'acide gras
- le chloramphénicol agirait uniquement sur le niveau des synthèses en diminuant le taux des ribosomes
- l'actinomycine D aurait une action sélective sur les synthèses d'ARN messagers nouveaux, indispensables pour diriger la formation des protéines impliquées dans la biogénèse de l'acide *linoléique* (constituants de l'oléyl-Coenzyme A-désaturase).

Ces données peuvent sembler en contradiction avec l'effet inhibiteur de l'actinomycine D sur la biosynthèse d'ARN, souvent étudié dans les tranches de tubercule après survie (CLICK et HACKETT, 1966-1967), (WILLEMOT et STUMPF, 1967b), (SAMPSON et LATIES, 1968). Mais ces expériences consistaient à suivre l'incorporation d'(1-¹⁴C)-uracile dans les molécules d'ARN nouvellement synthétisées et ne pouvaient toucher les molécules d'ARN préformées ; cette apparente contradiction reçoit donc une solution convenable.

Les tranches de tubercule en survie sont un bon matériel pour étudier la régulation et le contrôle des synthèses des acides gras. Rien n'est connu concernant les mécanismes précis dirigeant les synthèses d'acide *linoléique*. Quant aux autres acides gras, que la cellule animale ou bactérienne peut synthétiser, on ne peut disposer que d'un petit nombre de faits expérimentaux. Quelques travaux ont mis en évidence les synthèses d'acides gras induites par des changements de l'état nutritionnel. On observe ainsi dans des rats sevrés une baisse importante de l'activité de la synthèse des acides gras dans le foie (TEPPERMAN et TEPPERMAN, 1958), due à la décroissance du taux des protéines enzymatiques (BUTTERWORTH et al., 1966). L'administration de nourriture privée de lipides induit une élévation importante de la synthèse des acides gras du foie qui atteint des intensités normales dues largement à la synthèse de nouvelles enzymes (TEPPERMAN et TEPPERMAN, 1958). L'induction de cette synthèse est inhibée par la puromycine (GIBSON et al., 1967) ; l'induction de l'acétyl-Coenzyme A-carboxylase est, elle aussi, sensible à la puromycine et l'actinomycine D (HICKS et al., 1965 ; GIBSON et al., 1967). D'autres exaltations adaptatives des synthèses d'acides ont été étudiées : transfert de cellules de fibroblastes de Souris dans un milieu ne contenant pas de lipides (sensible à la cycloheximide (RAFF, 1970)), foie de Pigeon

sevré (WAKIL, 1970), transfert de *Lactobacillus plantarum* en milieu pauvre en acides gras (HENDERSON et Mc NEIL, 1966 ; WEEKS et WAKIL, 1970), *Escherichia coli* (WEEKS et al., 1969). Il est intéressant de noter qu'un temps de latence de 6 heures est nécessaire pour ces exaltations (BURTON et al., 1969) et qu'un maximum d'activité est observé à 10 heures (BURTON et al., 1969).

Toutes ces données montrent des analogies remarquables entre les phénomènes observés et les événements qui se produisent au cours de la survie : induction des synthétases, action des inhibiteurs, chronologie des phénomènes , utilisation de réserves chez l'animal. Les nombreuses questions qui se posent à propos de ces phénomènes indiquent combien serait pertinente une étude plus approfondie des mécanismes de régulation de ces synthétases.

V I I - S U R V I E E T C R O I S S A N C E

L'activité métabolique intense des cellules en survie, les modifications importantes de l'ultrastructure, les dérégpressions génétiques que l'on peut noter, suggèrent que les cellules primitivement différenciées retournent vers un état semi-méristématique. Il était donc opportun de comparer les cellules en survie aux cellules de tissu en croissance ; la solution la plus logique était d'étudier des organes en croissance issus du tubercule de Pomme de terre, c'est à dire les stolons ou les germes. Si un des phénomènes les plus caractéristiques de la survie, la synthèse de l'acide *linoléique*, accompagne la biogénèse de nouvelles membranes, nous devrions retrouver dans les tissus en croissance des synthèses élevées de cet acide.

A - CYTOLOGIE COMPAREE.

=====

Nous avons retrouvé dans les tissus des germes, des stolons ou des tubercules-fils les principales caractéristiques morphologiques observées dans les cellules en survie.

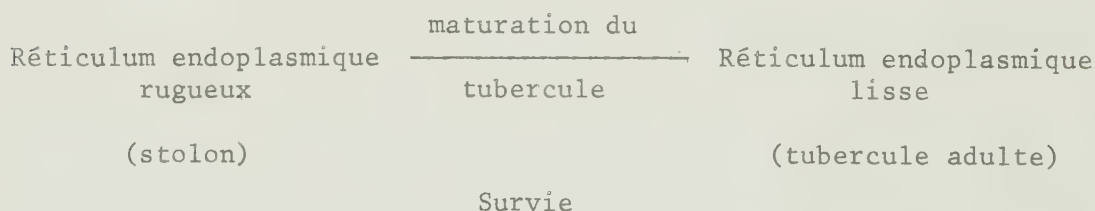
1) Population ribosomale.

Les ribosomes sont très abondants dans le cytoplasme des cellules des différents tissus en croissance (*Fig. 73*). Ces ribosomes sont souvent liés aux membranes du réticulum endoplasmique. On observe ainsi que les ribosomes sont parfois réunis entre eux, en petits paquets. La présence de polyribosomes, si caractéristiques des cellules en survie, n'est pas notée ; on peut cependant distinguer quelques structures polyribosomales çà et là. Cela s'explique probablement par le fait que l'observation des cellules en survie se fait toujours au moment du déclenchement de nouvelles synthèses : en effet, dans ce cas, l'expérimentateur déclenche lui-même le processus. Dans le cas des tissus de stolon, on ne sait pas, en examinant une cellule, quand les synthèses ont effectivement commencé. Signalons cependant les observations de polyribosomes dans certaines cellules méristématiques en activité : méristème caulinaire d'Epinard (AUDERSET, communication

personnelle), *Cambium d'Acer pseudoplatanus* (CATESSON, communication personnelle), graines de Coton (WATERS et DURE, 1966) ou de Radis en imbibition (JULIEN, 1971) ; ces observations sont cependant rares et probablement difficilement reproductibles alors que, dans les cellules en survie, leur présence est toujours constante. D'autre part, des difficultés techniques (fixation des coupes examinées) peuvent expliquer leur absence apparente dans les micrographies.

2) Membranes du réticulum endoplasmique (Fig. 75).

Comme dans les cellules en survie, les membranes du réticulum endoplasmique sont très développées dans les cellules des stolons, des tubercules-fils et des germes (Fig. 73). Il est intéressant de noter que dans certaines régions cellulaires du tubercule-fils, nous avons observé la présence du réticulum endoplasmique "lisse" (sans ribosomes) (Fig. 74) ; il est tentant de suggérer qu'une évolution des structures du réticulum se produit pendant la maturation du jeune stolon ou du tubercule adulte ; le réticulum endoplasmique "rugueux" serait abondant dans les cellules jeunes, favorisant les synthèses, puis apparaîtrait un réticulum lisse par départ des ribosomes.



Pendant la survie, on assiste à un développement important du réticulum endoplasmique granulaire ; des images évoquant des formes transitoires passant vers le réticulum lisse sont effectivement observées dans certaines micrographies.

3) Dictyosomes.

Nous avons signalé que se produit, dans les cellules en survie, une apparition de structures dictyosomales, en pleine activité, qui n'existent

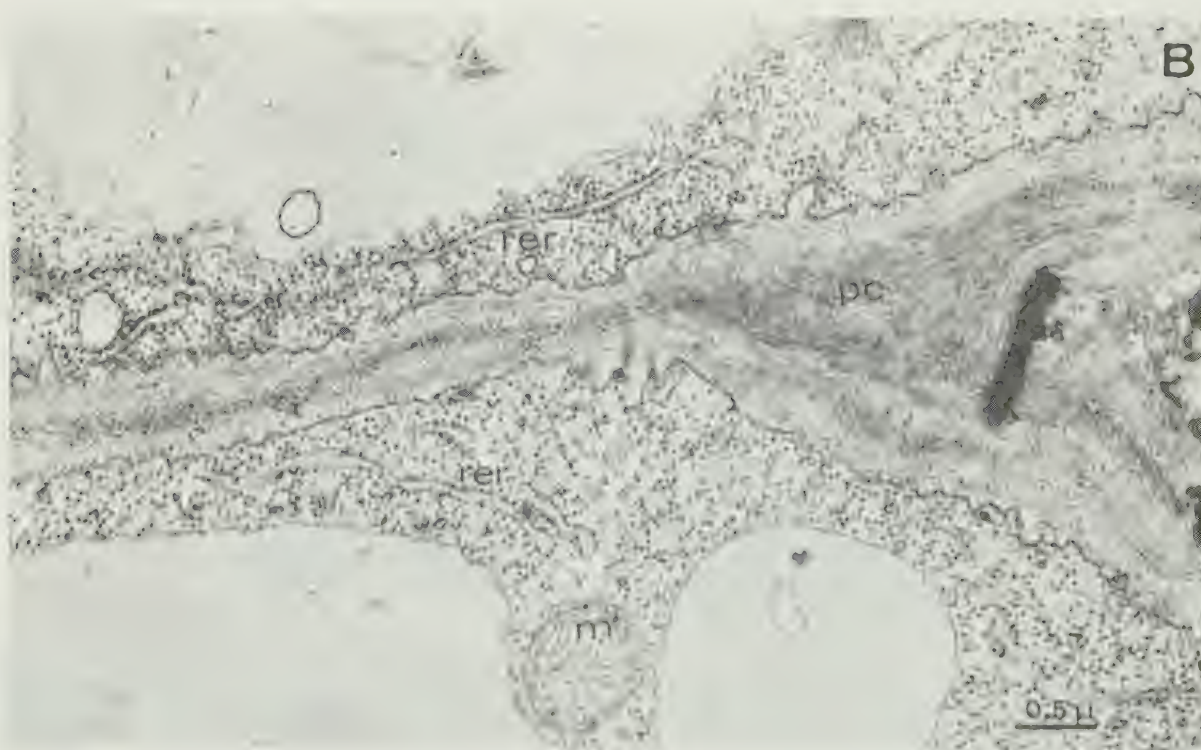
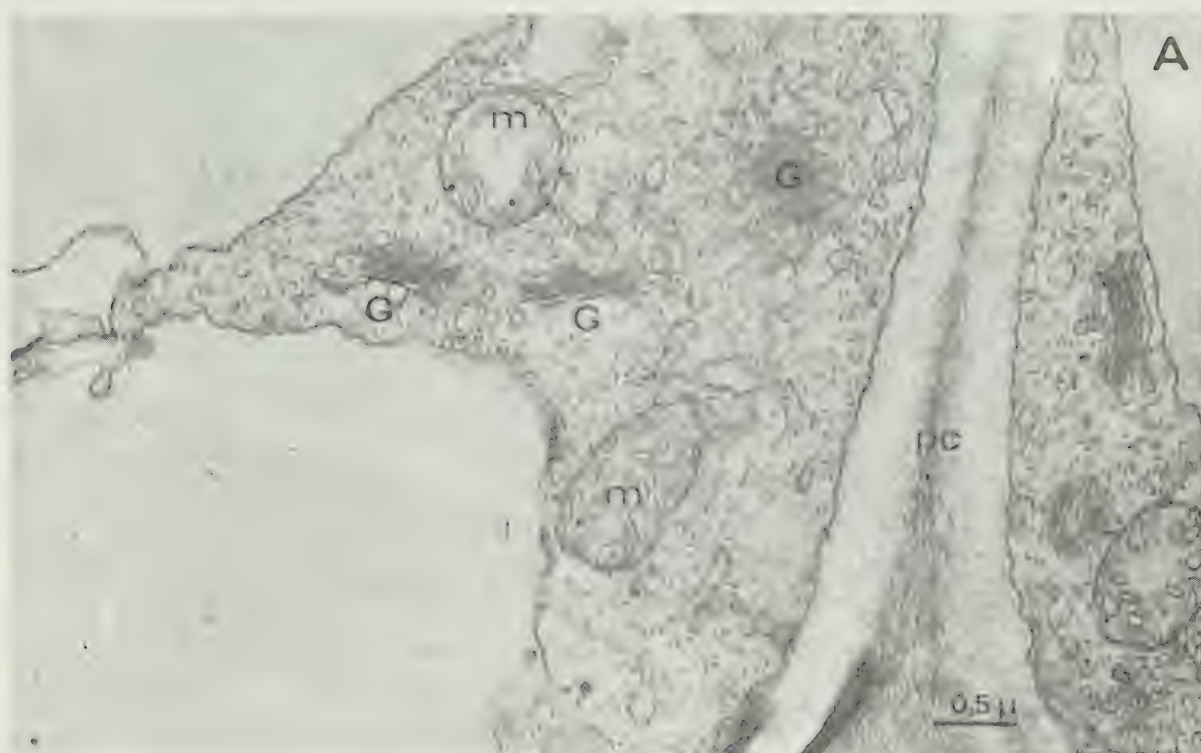


Fig. 73. Micrographies de zones cytoplasmiques des cellules de stolons d'un plant de Pomme de terre. En A et B, on observe une forte densité ribosomale et, en B, la présence d'un réticulum endoplasmique granulaire. En A, des dictyosomes sont nettement visibles. On note l'aspect contracté des mitochondries.

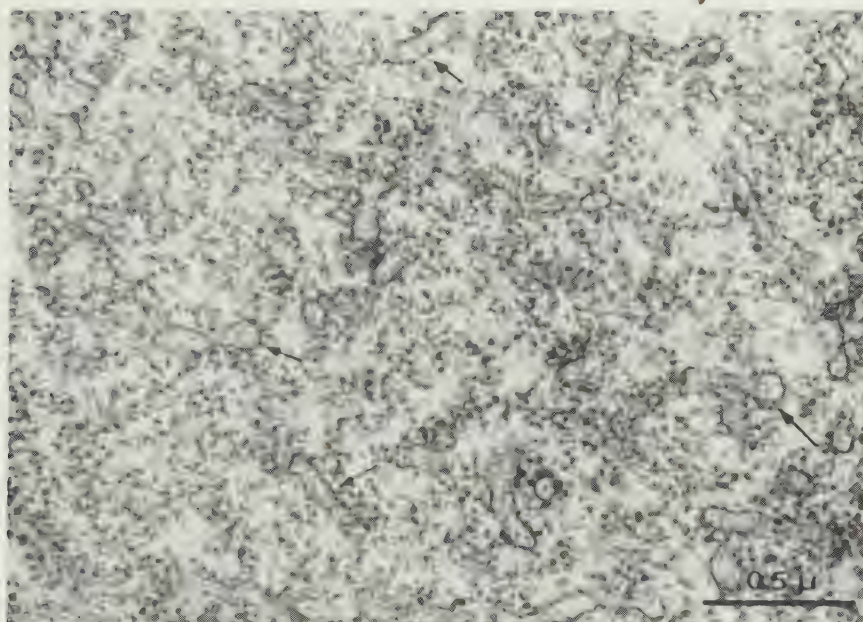


Fig. 74. Réticulum endoplasmique lisse observé dans une cellule de tubercule-fils.

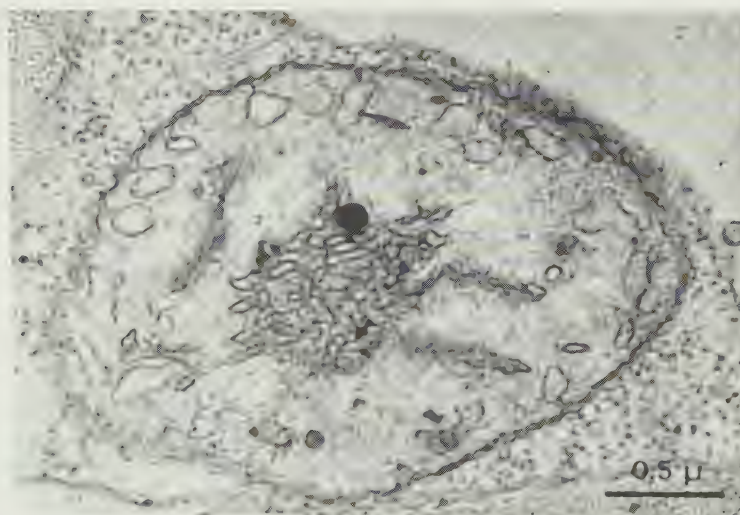


Fig. 75. Etioplaste caractéristique rencontré dans une cellule de germe.

pas dans les tranches de tubercules fraîchement coupées. Dans les cellules de stolon, de germe ou de tubercule-fils, on retrouve des structures dictyosomales en pleine activité (*Fig. 73*).

4) Mitochondries.

Dans les cellules en survie, nous avons eu des difficultés à observer des modifications ultrastructurales importantes des mitochondries, en réalisant ces examens *in situ*. *In vitro*, par contre, nous avons observé d'une part la présence de filaments que l'on peut identifier à de l'ADN mitochondrial, d'autre part des images suggérant des figures de division.

Dans les cellules de stolons ou de tubercule-fils, il est très fréquent de rencontrer des mitochondries possédant une zone claire, contenant des filaments nombreux qu'il est possible d'identifier, par comparaison avec les micrographies publiées dans la littérature, à de l'ADN mitochondrial (*Fig. 76*). Cette observation, qui peut être facilement faite dans les cellules méristématiques, confirme pleinement les hypothèses que nous avons émises à propos des images obtenues dans les tissus en survie ; les mitochondries de ces cellules sont donc de type "jeune". De nombreuses images montrent des mitochondries souvent groupées par deux ou accolées ; dans certains cas, on peut suggérer que les mitochondries sont à l'étape ultime du processus de division sans que l'on puisse bien observer une certaine continuité des membranes aussi nette que dans les images que nous donnons dans les cellules en survie.

5) Plastes.

Le bouleversement de la population plastidiale est une des caractéristiques morphologiques les plus nettes des cellules en survie : dans ces cellules, apparaissent des plastes peu différenciés, à stroma dense, de petite taille.

Dans les cellules de stolons, de germes, de tubercules-fils, on retrouve une population plastidiale identique à celle qui se développe dans les cellules en survie.

a) Tubercule-fils (Fig. 77).

La population plastidiale est constituée d'amyloplastes différenciés, peu abondants, et surtout de plastes de petite taille, à stroma dense. La double membrane est très nette et il existe un "réticulum périphérique plastidial" analogue à celui rencontré dans les plastes observés dans les cellules en survie. Ces plastes présentent souvent des zones claires, laissant supposer l'existence d'un ADN plastidial. Des inclusions osmiophiles sont présentes.

b) Germes (Fig. 75).

Les amyloplastes différenciés sont beaucoup moins nombreux que dans les tranches de tubercule adulte. Les plastes peu différenciés sont rencontrés très fréquemment. Ils ont un stroma dense, une double membrane nette, un réseau membranaire. Des inclusions sont présentes : globules osmiophiles et ferritine ; ces caractéristiques sont les mêmes que celles des plastes des cellules en survie. De plus, des caractéristiques propres à cette population plastidiale apparaissent : les lamelles tendent à s'organiser, à s'arranger en réseau parallèle ; des formes étoilées caractéristiques sont rencontrées parfois. Tous ces détails indiquent qu'il s'agit d'étioplastes pouvant évoluer vers des formes chloroplastiques quand ils sont éclairés. Ceci n'est pas surprenant dans le cas du germe, dont la partie aérienne évolue en tige (MADEC et PERENNEC, 1959).

c) Stolons (Fig. 77).

Les amyloplastes sont pratiquement absents dans les stolons. On trouve des plastes denses, tout à fait analogues à ceux observés dans les cellules en survie ; on rencontre une autre population plastidiale composée de plastes à stroma plus clair, contenant des inclusions osmiophiles, avec peu ou pas d'amidon et des lamelles rudimentaires ; ces structures plastidiales sont probablement des formes de transition de leucoplastes en chloroplastes.

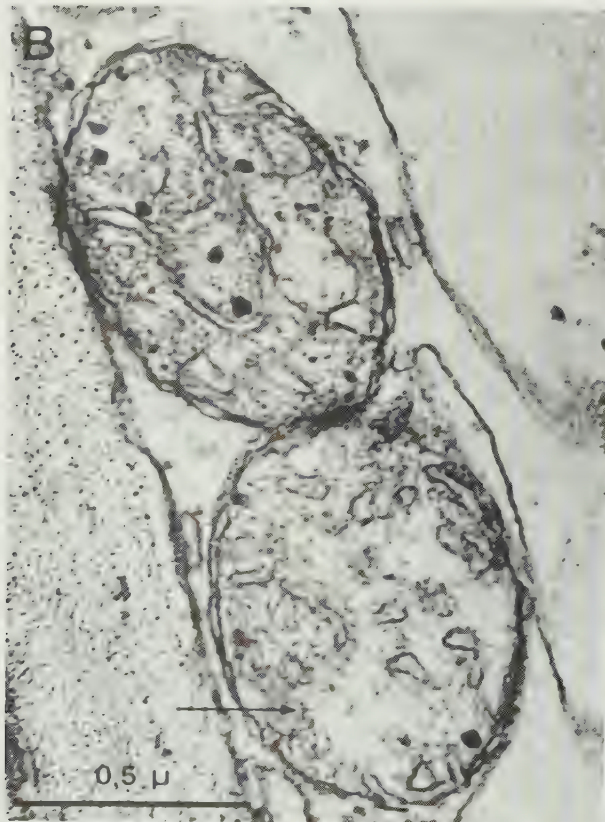
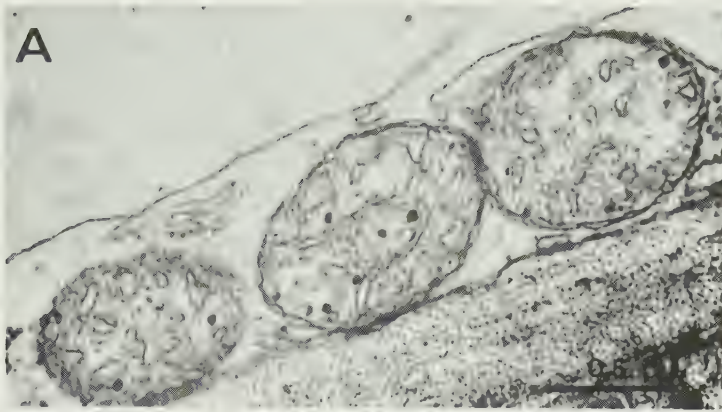


Fig. 76. Quelques aspects de mitochondries de cellules de stolons de Pomme de terre (A = faible grossissement ; B = fort grossissement). On note la présence de filaments qui sont probablement de l'ADN mitochondrial.



Fig. 77. Populations plastidiales apoptotiques dans les cellules de *Limnospira* (A, B) et de *Microcystis* (C). On peut observer le stroma dense des plastides, plus sombre que celui des plastides dans les cellules en survie.
i = inclusion.

DISCUSSIONS.

Les cellules de tubercules en survie et les cellules des stolons, des germes ou des tubercules-fils présentent de nombreuses analogies ultrastructurales. La survie et la croissance provoquent l'apparition de nombreuses membranes intracellulaires.

Cette étude cytologique des organes en croissance montre donc que la biogénèse des membranes intracellulaires - réticulum endoplasmique, dictyosomes, etc...-est soumise à une stricte régulation au cours de la vie des cellules, et que ce processus n'est actif qu'à certains moments du développement cellulaire.

B - LIPOGENESE COMPAREE.

Nous nous sommes proposés de comparer la lipogénèse *in vivo* dans des cellules de tubercule adulte *maintenues en survie* et dans des cellules de tissus en croissance, n'ayant subi *aucune survie*.

1) Intensité des biosynthèses.

Comme le montre le tableau XLVII, les acides gras des microsomes des organes en croissance sont intensément radioactifs, après 1 heure d'incubation. Les synthèses sont très actives dans les stolons et les germes, et légèrement moins intenses dans les tissus du tubercule-fils. Ces biosynthèses sont plus intenses (plus de 10 fois plus élevées) dans les stolons et les germes que dans le tubercule-mère. Ceci est à rapprocher des intensités biosynthétiques très élevées que possèdent les tissus de tubercule adulte en survie alors que les tranches fraîchement coupées sont moins actives (intensités 9 à 10 fois plus fortes après 9 heures de survie).

2) Nature des acides gras synthétisés.

Le résultat le plus remarquable est la synthèse élevée d'acide *linoléique* par tous ces tissus (Tableau XLVII) ; cet acide gras contient

TABLEAU XLVII

Incorporation de l'(1-¹⁴C)-acétate in vivo dans les microsomes isolés de différents organes d'un tubercule de Pomme de terre en croissance.

On a indiqué dans le tableau le pourcentage de la radioactivité totale retrouvé dans les acides gras ainsi que la radioactivité totale exprimée en cpm/gramme de matière fraîche.

	% de radioactivité					cpm/g
	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}		
Germes	34,4	10,8	31,0	23,8		234.000
Stolons	27,2	14,5	29,4	28,6		252.000
Tubercules néoformés	40	2,3	42,1	15,1		17.800
Pour comparaison :						
tranches de tubercules en repos végétatif maintenues en survie	18,7	14	33,8	27,2		21.400

de 15 à 28,6% de la radioactivité totale présente dans les acides gras totaux, selon ces expériences ; cette synthèse d'acide *linoléique* est particulièrement active dans les stolons et les germes, moins intense dans le tubercule-fils et assez élevée dans le tubercule-mère germé.

Ceci montre clairement que la synthèse de l'acide *linoléique* intervient d'une façon importante dans les cellules qui sont le siège d'une intense biogénèse membranaire. On peut remarquer que le tissu de tubercule-mère germé est actif et synthétise d'une façon importante l'acide *linoléique*, alors que le tubercule au repos végétatif synthétise faiblement cet acide gras ; le traitement de la "survie" provoque l'apparition de synthèses élevées de l'acide *linoléique* coïncidant avec une biogénèse importante de membranes.

La synthèse active d'acide *linoléique* dans les tranches de tissus en croissance n'est pas provoquée par la coupe des tissus ; en effet, dans une série d'expériences (*Fig. 78*), nous avons étudié des stolons entiers

- 1) en déposant une solution d'acétate radioactif directement à la surface du tissu,
- 2) en trempant le stolon dans la solution contenant le précurseur radioactif et en analysant les tissus éloignés de l'extrémité coupée. Comme le montrent les radiochromatogrammes, la synthèse d'acide *linoléique* est très importante, et n'est donc pas liée à un traumatisme provoqué par la blessure.

La capacité de synthèse élevée d'acide *linoléique* dans les tissus en croissance, élaborant des membranes intracellulaires, est une donnée assez nouvelle. En effet, peu d'expériences ont porté sur la régulation de la biosynthèse des acides gras polyinsaturés pendant la croissance des tissus : citons les travaux de THIBAUDIN (1970) et de TREMOLIERES (1972).

3) Biosynthèse des acides gras dans des tranches de tubercule germé maintenues en survie.

Toutes les données expérimentales indiquent que la survie provoque le "réveil" d'un tubercule préalablement au repos. Si l'état physiologique de ce tubercule est tel que les processus impliqués dans l'activation métabolique provoquée par la survie sont déjà en partie déclenchés, on risque d'observer une intensification des phénomènes accompagnant la survie. En effet, le tubercule-mère germé portant germes, stolons et tubercules-fils, manifeste sans aucune survie des capacités de synthèse d'acide *linoléique*.

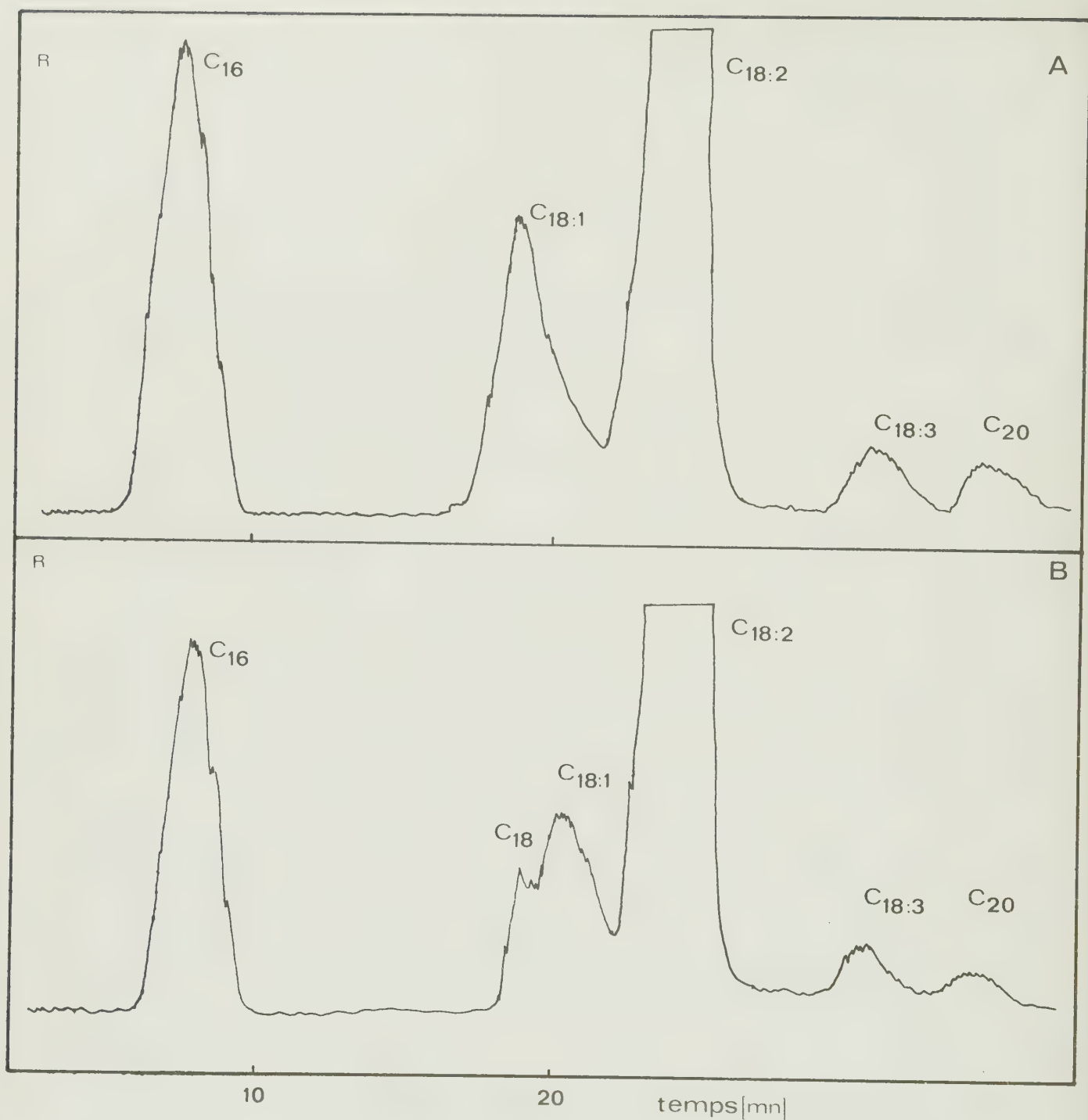


Fig. 78

Comparaison des capacités de biosynthèse lipidique de tissus en croissance (stolons) (A) et de tranches de tubercule maintenues 24 heures en survie (B). Biosynthèse *in vivo* des acides gras.

En A , une solution d'acétate radioactif est déposée sur des stolons laissés sur le plant de pomme de terre ; l'extraction des acides gras a lieu après 16 heures d'expérience.

En B , des tranches de tubercule sont mises en incubation dans une solution d'acétate radioactif pendant deux heures, puis sont maintenues en survie en milieu normal pendant 14 heures.

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

TABLEAU XLVIII

Distribution de la radioactivité entre les acides gras de microsomes isolés de tranches de tubercule en repos végétatif, de tranches de tubercule maintenues en survie, de tranches de tubercule-mère fraîchement coupées et de tranches de tubercule-mère préalablement maintenues en survie.

Le précurseur radioactif ($(1-^{14}\text{C})$ -acétate) est administré *in vivo*.

	Tranches de tubercule en repos végétatif		Tranches de tubercule-mère	
	Frais	Survie	Frais	Survie
	% de radioactivité			
C_{16}	26,1	18,7	13,6	22,4
C_{18}	8,1	14,0	6,6	12,0
$\text{C}_{18:1}$	63,0	33,8	55,4	23,1
$\text{C}_{18:2}$	<u>0</u>	<u>27,2</u>	<u>24,4</u>	<u>42,4</u>

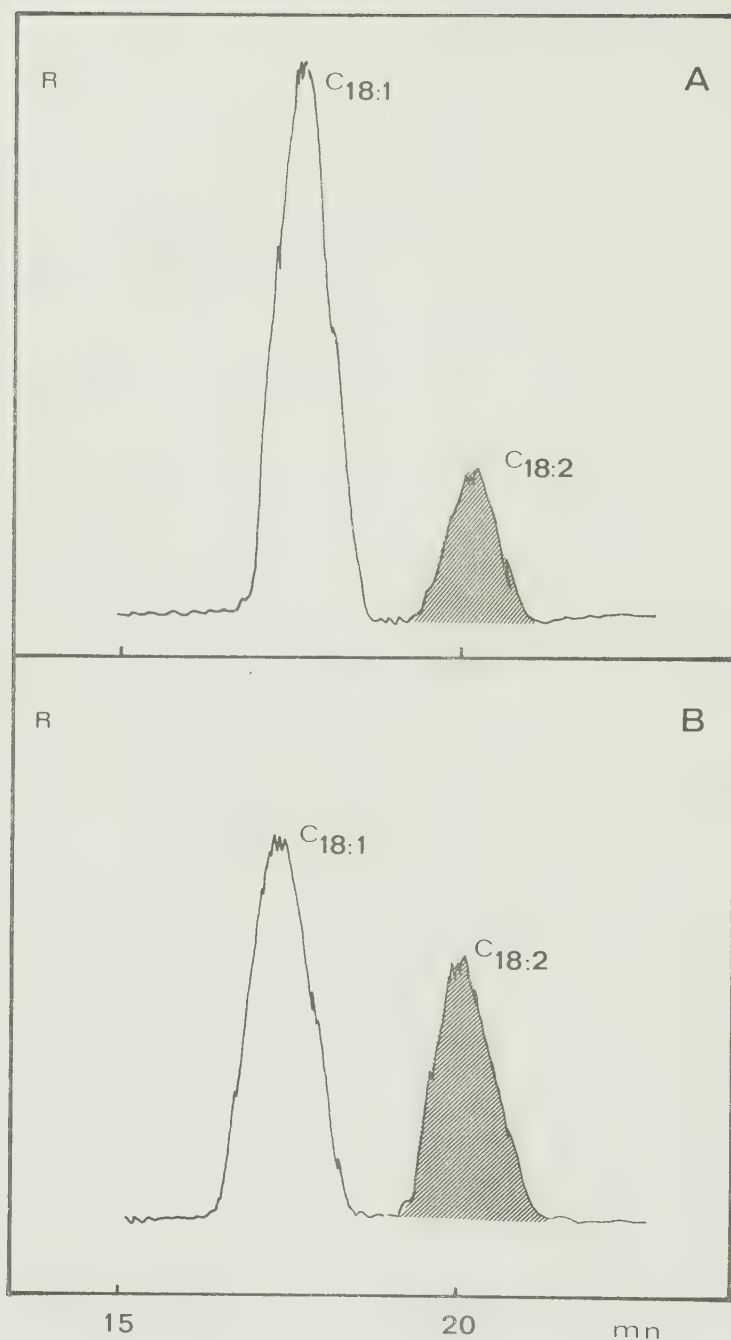


Fig. 79

Comparaison des capacités de désaturation in vitro de l'oléyl-coenzyme A marqué des microsomes isolés de stolons sans survie préalable (A) et des microsomes isolés de tranches de tubercule maintenues en survie (B).

L'abréviation R est expliquée dans la figure 31.

Dans les tranches fraîches de tubercule germé, l'acide *linoléique* est radioactif, ainsi que nous l'avons signalé dans le précédent paragraphe. Dans les tranches de tubercule germé en survie, l'acide *linoléique* devient maintenant l'acide gras le plus radioactif (plus de 42% de la radioactivité des acides totaux), résultat jamais obtenu après survie de tranches de tubercule non germé (*Tableau XLVIII*).

Ces résultats sont à rapprocher d'expériences similaires de CHERIF (1972) qui, en traitant des tubercules en repos végétatif par la Rindite, trouve une exaltation appréciable des biosynthèses déclenchées lors du maintien en survie, par rapport aux tubercules témoins non traités.

Les biosynthèses élevées d'acide *linoléique* dans le tubercule germé, avant toute survie, et l'exaltation de ces biosynthèses provoquée par la survie, indiquent que dant le tubercule sorti du repos végétatif, les dérèpressions des potentialités génétiques ont déjà eu partiellement lieu : les différences qualitatives avec la survie sont moins marquées ; par contre le maintien en survie ajoute les dérèpressions artificielles aux dérèpressions naturelles.

4) Activité de l'oléyl-Coenzyme A désaturase.

Une confirmation supplémentaire des synthèses élevées des stolons et des germes est apportée par l'étude de l'oléyl-Coenzyme A désaturase associée aux microsomes de ces tissus. Nous avons montré plus haut que les microsomes isolés de tubercule au repos étaient incapables d'une telle activité enzymatique, alors que les microsomes isolés de tissu en survie étaient très actifs.

En réalisant ces expériences sur des stolons sans survie préalable, nous devons retrouver une activité élevée de l'oléyl-Coenzyme A désaturase si le parallèle entre tissu en survie et cellule en croissance est correct. C'est exactement ce que nous obtenons : en 30 mn plus de 14% de l'oléyl-Coenzyme A marqué (*Fig. 79*) est transformé en acide *linoléique* par les microsomes isolés de stolons ; cette désaturation - tout comme celle analysée dans les microsomes de tissus en survie - nécessite de l'oxygène et un nucléotide réduit.

Le fait que le pourcentage de désaturation soit plus faible que

TRANCHES EN SURVIE

Diminution des réserves

Plastes "jeunes" à stroma
dense

Nombreux dictyosomes

Réticulum endoplasmique
abondant

CELLULES EN CROISSANCE

Mitochondries "actives"

Capacités de biosynthèse
élevées

Biosynthèse de l'acide
linoléique

Fig. 80

Caractéristiques cytologiques et biochimiques communes
aux tissus en croissance et aux tranches de tubercule adul-
tes maintenues en survie.

celui obtenu dans les tissus en survie peut s'expliquer par l'hétérogénéité des cellules constituant le stolon, dont de nombreuses cellules doivent avoir atteint un état adulte. Ceci renforce l'intérêt de la survie, qui nous permet de déterminer l'évolution physiologique d'un ensemble de cellules relativement homogène.

C - CONCLUSIONS.

=====

Les caractéristiques ultrastructurales et biosynthétiques des cellules en survie et des cellules de tissus en croissance montrent de nombreux points communs. Le procédé de survie permet donc de provoquer artificiellement des phénomènes qui se produisent normalement pendant la vie de la plante : biogénèse de nouvelles membranes, biosynthèse de constituants lipidiques essentiels (*Fig. 80*).

Les données acquises sur le tubercule de Pomme de terre indiquent clairement, en effet, que la synthèse de l'acide *linoléique* est strictement liée à l'état physiologique de l'organe (*Fig. 81*). Cette synthèse ne se ferait qu'à des moments bien précis du développement de la cellule, pendant lesquels les enzymes de la lipogénèse sont en pleine activité. Nous avons établi que ces moments coïncident avec un développement important des structures membranaires ; une telle corrélation constitue une observation nouvelle.

En particulier, l'oléyl-Coenzyme A-désaturase indispensable à la synthèse de l'acide *linoléique* est induite dans les cellules qui élaborent leurs membranes. Cette hypothèse implique que les constituants lipidiques synthétisés à certains moments de la vie de la plante présentent une certaine stabilité. Nous avons montré cela en étudiant les temps de renouvellement des phospholipides et des acides gras liés aux membranes mitochondriales ou microsomales de tubercule de Pomme de terre adulte (BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1971) ; les demi-périodes, variant de 5 à 30 jours, selon les constituants lipidiques étudiés indiquent clairement leur lent renouvellement.

On retrouve, dans les cellules du tubercule elles-mêmes, une évolution progressive de leurs caractéristiques biochimiques pendant la conservation : dans le tubercule-mère après plusieurs mois de conservation, on observe une synthèse appréciable d'acide *linoléique*, synthèse qui était nulle dans le tubercule au repos végétatif conservé depuis moins de 3 mois.

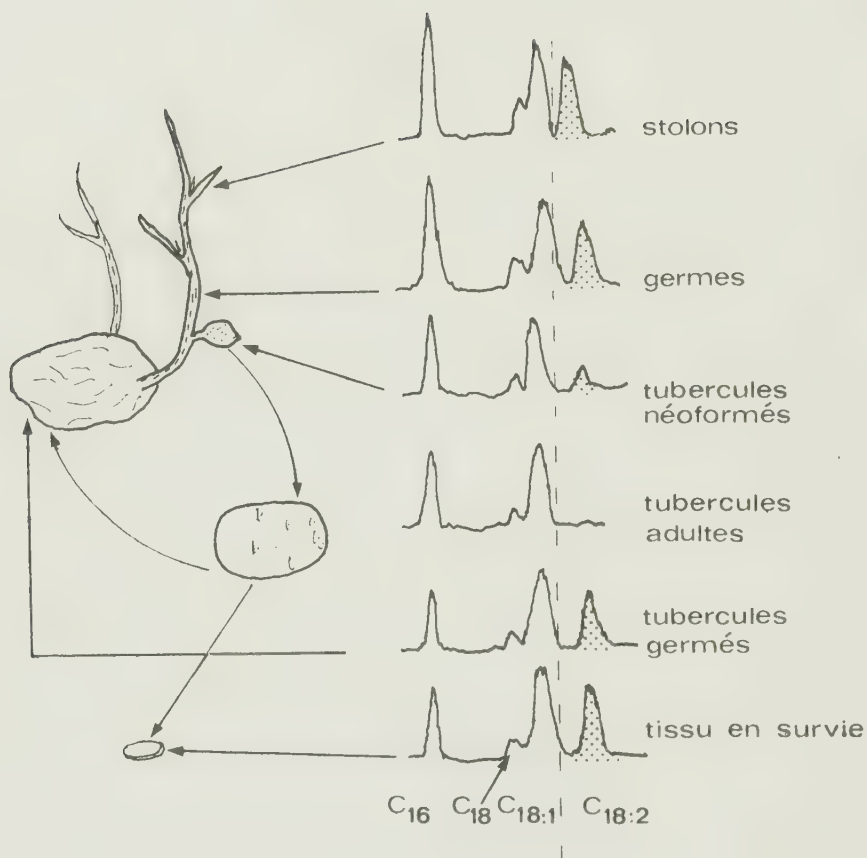


Fig. 81

Capacités de biosynthèse de l'acide linoléique dans les différents organes du plant de pomme de terre et des cellules en survie.

Les portions de radiochromatogrammes donnent la distribution de la radioactivité parmi les acides gras des microsomes des tranches de ces tissus, après incubation in vivo en présence d'acétate marqué.

Par contre la survie permet de provoquer cette synthèse, même en période de repos végétatif. Ceci montre qu'une modification très lente se produit pendant la conservation du tubercule, modifications que la survie peut induire en quelques heures (Fig. 81).

Nous sommes tentés de penser que les mécanismes déclenchant les phénomènes de survie sont les mêmes que ceux qui déclenchent la reprise de la croissance des germes ; on peut imaginer dans les deux cas la même dérèpression des potentialités génétiques. Cette hypothèse a été émise il y a quelques années par TUAN et BONNER (1964), confirmée par MADISON et RAPPAPORT (1968) qui ont mis en évidence une dérèpression de l'activité génétique lorsque les bourgeons de tubercule de Pomme de terre sortent de leur période de repos végétatif, par addition de Rindite (un agent de rupture du repos végétatif (JOLIVET, 1970 ; CHERIF, 1971)); cette reprise de l'activité métabolique des bourgeons est accompagnée (ou précédée) par une synthèse importante d'ARN. Ces hypothèses montrent que l'étude du phénomène de survie peut contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes d'éveil activement étudiés en Physiologie Végétale.

L'observation que des cellules en survie évoluant vers le sens physiologique "normal" se retrouve dans la comparaison de nos résultats avec des expériences accomplies par le groupe de HULME et GALLIARD sur les fruits : la survie de tranches de Pomme (fruits à l'état préclimactérique) provoque en quelques heures l'induction de phénomènes accompagnant l'évolution normale des fruits, et en particulier une oxydation de plus en plus forte des acides gras, sans biosynthèse d'acide *linoléique* (GALLIARD et al., 1968 ; HULME et al., 1968). L'évolution se produit, dans ce cas, vers une réelle sénescence et correspond au comportement physiologique réel du fruit entrant, après la crise climactérique, en sénescence, et n'évoluant pas comme dans le tubercule de Pomme de terre, vers une reprise de croissance.

TABLEAU XLIX

Phénomènes accompagnant la survie des tranches de tubercule de Pomme de terre.

REMANIEMENTS CYTOLOGIQUES	TRANSFORMATIONS BIOCHIMIQUES	STIMULATION DES SYNTHESES
Formation de polyribosomes	Augmentation de la masse des protéines microsoma- les et mitochondriales	Augmentation de la bio- synthèse des protéines microsomaux et mitochon- driales
Développement des membra- nes du réticulum endo- plasmique	Augmentation de la masse des phospholipides et des acides gras des mitochon- dries	Stimulation de la biosyn- thèse des phospholipides et des acides gras
Développement de l'appa- reil de Golgi		
Apparition de jeunes plastides	Constance de la composi- tion en masse des phospho- lipides et des acides gras de ces fractions cellulaires	Induction de l'oléyl- coenzyme A désaturase
"Croissance et division mitochondriales"	Stimulations de la NADH- cytochrome c-réductase mitochondriale et microso- male	
	Augmentation de l'inten- sité respiratoire mito- chondriale	

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DE LA SURVIE

Il nous paraît d'abord utile de regrouper dans les tableaux XLIX et L les événements principaux que nous avons observés au cours de la survie des tranches de tubercules de Pomme de terre. Cet ensemble de données constitue la première étude complète des transformations subies par différents compartiments cellulaires pendant la survie. Ces résultats établissent nettement qu'une *biogénèse importante des membranes liées aux organites cellulaires ou au réticulum endoplasmique survient au cours de la survie*, phénomène qui n'avait jamais été démontré auparavant. L'utilisation de différentes méthodes d'approche autorise une telle affirmation : l'observation de l'ultrastructure cellulaire, les dosages biochimiques et la mesure des capacités de biosynthèse ; seule la mise en oeuvre de ces diverses techniques peut limiter les faiblesses de chaque méthode prise isolément.

Les examens cytologiques nous ont révélé que tous les compartiments cellulaires subissent de nombreux remaniements : on observe une formation de polyribosomes, un développement des membranes du réticulum endoplasmique et des dictyosomes, une apparition de jeunes plastes, des modifications (bien que moins nettes) de la population mitochondriale.

Les dosages biochimiques - qui indiquent une augmentation de la teneur en protéines et en phospholipides des culots microsomaux et mitochondriaux - confirment cette biogénèse de membranes.

Les études métaboliques nous ont montré qu'il se produisait *in vivo* pendant les premières heures de la survie une stimulation très importante des synthèses phospholipidiques et protéiques, ainsi qu'une biosynthèse importante d'acides gras, en particulier d'acide *linoléique* ; tous ces lipides nouvellement synthétisés s'insèrent rapidement dans les membranes microsomales et mitochondriales. Le fait que les phospholipides les plus abondants, ainsi que les acides gras majeurs, sont abondamment synthétisés au cours de la survie indique que ces sont des *membranes de composition lipidique normale qui sont synthétisées*, suggérant une stricte régulation des biosynthèses. Des mesures d'activités enzymatiques ont montré que les membranes ainsi formées sont fonctionnelles.

Les études métaboliques conduites in vitro nous ont permis d'acquies des données nouvelles sur les capacités de biosynthèse des fractions cellulaires isolées. D'une part, nous avons confirmé, sur des fractions mitochon-

TABLEAU L

Remaniements métaboliques accompagnant la survie du tubercule de Pomme de terre.

	MICROSOMES		MITOCHONDRIES	
	Frais	survie	frais	survie
Protéines mg/100 g matière fraîche initiale	38	52,8	3,5	6,4
Incorporation de la leucine tritiée dans les protéines (cpm/mg protéine)	1688	22790 (9h survie)	1016	5884 (9h survie)
QO ₂ (μl O ₂ /h/mg protéines)	-	-	40,0	44,7
Contrôle respiratoire	-	-	3,0	2,6
NADH-cytochrome c-réductase (nanomoles de cyt. c-réduit mg ⁻¹ mn ⁻¹)	39	122	30,2	109
+ antimycine A	38	122	2,5	8,2
Glucose-6-phosphatase (μmoles phosphate. mn ⁻¹ . mg ⁻¹)	0,123	0,093	-	-
Succinate-cytochrome c-réductase (nanomoles cyt. c réduit mg ⁻¹ . mn ⁻¹)	-	-	8,1	5,1
Phospholipides (mg.100g ⁻¹ matière fraîche initiale)	11,5	14,2	0,51	0,97
Acides gras (mg.100g ⁻¹ matière fraîche initiale)	7,3	8,8	0,35	0,70
Incorporation in vivo de l'acétate marqué dans les lipides (nanomoles.mg ⁻¹ . heure ⁻¹)	0,35	1,70	0,14	0,68
% radioactivité dans les acides gras (après incubation in vivo)				
C ₁₆	16,1	18,7	18,2	29,7
C ₁₈	8,1	14,0	5,9	4,6
C _{18:1}	63,0	33,8	62,1	35,6
C _{18:2}	0	27,2	0	24,1
Oléyl-Coenzyme A désaturase (en nanomoles acide linoléique synthé- tisées. mg ⁻¹ . heure ⁻¹)	0	3,1	0	0,1
(ou en % de désaturation)	0	44,5	0	2,1

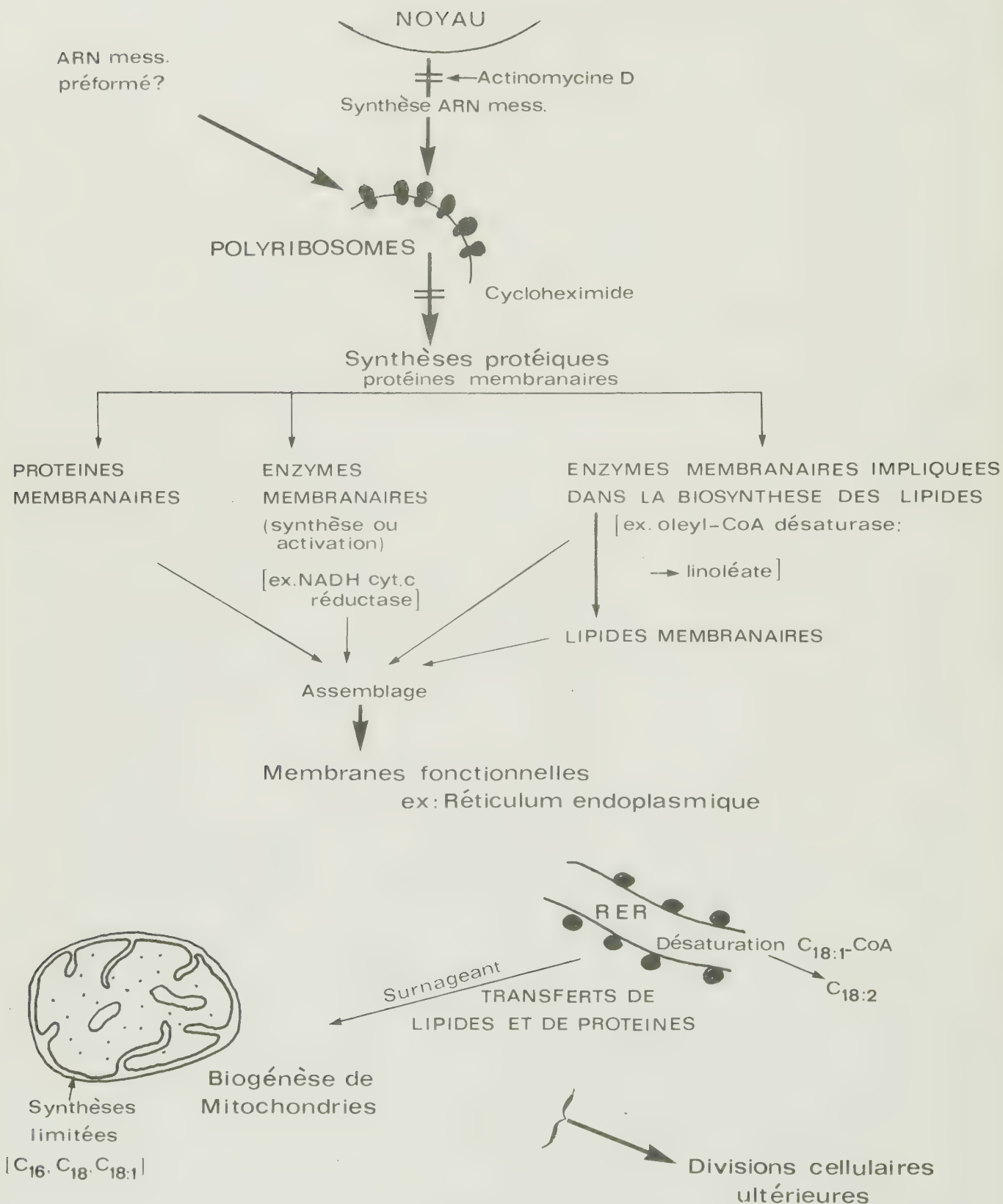


Fig. 82

Les étapes métaboliques et cytologiques parcourues au cours de la survie de tranches de tubercule de pomme de terre. Interprétations proposées.

La mise en oeuvre de ces biosynthèses très actives de phospholipides et d'acides gras *dépend strictement de la synthèse de protéines nouvelles*. L'introduction de cycloheximide ou de puromycine inhibe totalement l'exaltation des synthèses lipidiques (notamment de l'acide *linoléique*), tout en supprimant les synthèses protéiques nouvelles et par conséquent la construction des membranes. Ce résultat peut recevoir trois interprétations différentes: 1) on peut supposer qu'il s'effectue pendant la survie une véritable synthèse de protéines enzymatiques, et en particulier celles responsables de la désaturation de l'acide *oléique* en acide *linoléique*: il se produirait ainsi une augmentation de la quantité de protéines enzymatiques. 2) la même hypothèse serait émise, mais concernerait seulement une partie complémentaire de l'enzyme, l'autre partie étant préexistante. 3) il se produirait la synthèse d'une protéine particulière qui aurait pour mission d'"activer" les protéines enzymatiques qui existeraient à l'état "inactif" dans le tissu en survie. Il est évident que nous n'avons aucun argument en faveur de l'une ou l'autre hypothèse, mais l'intervention d'une synthèse de protéines dans les synthèses lipidiques pourra être commodément étudiée dans les cellules en survie. Si une synthèse protéique semble, elle aussi, indispensable à la stimulation de la synthèse des acides gras, une synthèse d'ARN ne semble pas strictement nécessaire à l'exaltation de la biosynthèse des acides gras saturés et monoinsaturés; par contre, le développement de la capacité de synthèse d'acide *linoléique* au cours de la survie est supprimé par l'actinomycine D, inhibiteur de la synthèse d'ARN. On peut supposer que la stimulation de la synthèse des acides saturés et monoinsaturés résulte de l'activation de complexes enzymatiques préexistants; l'acétyl-coenzyme A-carboxylase, qui joue un rôle important dans la synthèse *de novo* des acides gras, semble être soumise à un contrôle allostérique (BURTON et STUMPF, 1966) (HEINSTEIN et STUMPF, 1969) (WEEKS et WAKIL, 1970); les facteurs extérieurs activant l'enzyme pourraient être soit la baisse brutale de la teneur en gaz carbonique de l'atmosphère entourant les cellules du tubercule, lors de l'excision des tranches, soit l'hydrolyse des réserves d'amidon, entraînant une augmentation des réserves hydrocarbonées immédiatement assimilables. Les réponses à ces questions présentent un intérêt général évident pour une meilleure connaissance des régulations des synthèses d'acides gras.

Quelle est la signification physiologique de la survie ? Les analogies morphologiques et métaboliques qui existent entre les cellules en survie et les tissus en croissance (germes et stolons) indiquent que les phénomènes provoqués au cours de la survie sont *les mêmes que ceux observés au cours du développement normal de la plante*. Certes, la survie a comme facteur in-

ducteur la blessure provoquée par le prélèvement du tissu, mais les événements observés au cours du traitement ne peuvent être interprétés comme de simples conséquences d'un traumatisme, ainsi que nous l'avons expliqué dans l'Histoire ; on peut imaginer, par contre, l'existence d'un processus de cicatrisation qui implique une certaine régénération du tissu ; les phénomènes observés au cours de la survie prépareraient des divisions cellulaires.

Il est certain que les cellules en survie *n'évoluent pas vers un état de sénescence* mais vers un état "jeune" marqué par de nombreuses caractéristiques ultrastructurales des cellules différenciées et par une grande activité métabolique, alors que la sénescence s'accompagne d'une dégradation des structures cellulaires et probablement par une répression progressive des activités génétiques. Au contraire, la survie s'accompagne d'un début de *dédifférenciation des cellules*. Au cours de la survie, on observe la transformation de cellules à *activité métabolique minimum* en des cellules où les *processus de croissance* sont déclenchés ; l'ultrastructure cellulaire des tranches fraîchement prélevées se réduit à des structures faiblement développées permettant l'entretien des fonctions physiologiques essentielles : mitochondries, membranes cytoplasmiques, amyloplast, noyau quiescent ; la survie provoque l'apparition de structures nouvelles, permettant *l'édification de constituants membranaires nouveaux*, clé d'une croissance normale des cellules.

La survie permet donc, dans les cellules du tubercule de Pomme de terre, de révéler les potentialités cachées de ces cellules, potentialités qui se manifesteront peu à peu au cours de la vie de la plante. La survie exacerbe en quelques heures les messages transmis par des mécanismes mystérieux des cellules du parenchyme jusqu'aux stolons, alors que ces ordres sont, en temps normal, transmis très lentement. Ces impulsions rythment les biogénèses des membranes cellulaires, la croissance des germes et la tubérisation des stolons : le tubercule-mère reste constamment le chef d'orchestre de la vie de la plante. La nature des stimuli - agissant tant dans le développement normal de la plante que dans notre système de survie - est encore inconnue, mais il semble bien qu'une *dérépression de l'activité génétique* soit commune à tous ces phénomènes. Une telle dérépression, que nous avons étudiée au cours de la survie, semble exister dans les bourgeons de Pomme de terre dont la dormance est levée. L'intérêt de l'étude de la survie pour tenter de connaître les facteurs déclenchant l'émission de ces "messages" est donc évident. D'autre part, l'examen des biosynthèses lipidiques et protéiques membranaires, qui s'exaltent pendant la survie, peut aider à mieux comprendre les phénomènes de croissance et de différenciation cellulaires, commandés par

un programme génétique bien précis.

L'intérêt physiologique de la survie est renforcé par la mise en évidence d'une *véritable régulation des synthèses des lipides membranaires*, notamment de l'acide *linoléique* (qui sert de "marqueur" pour ces biosynthèses) au cours de la vie du plant de Pomme de terre. Ces lipides sont synthétisés intensément à certains moments de la vie de la plante, quand les membranes cellulaires se forment ; une fois mis en place, les constituants membranaires ne seraient soumis qu'à un lent renouvellement, un système d'entretien permettant de renouveler les molécules lipidiques qui se trouveraient "usées" ou dégradées. *Ce lien entre biosynthèse des lipides majeurs et biogénèse des membranes* - qui n'a jamais été établi auparavant - explique les synthèses très faibles qui existent dans les organes adultes, où règne une stabilité des constituants lipidiques qui contraste, par exemple, avec les rapides biogénèses dans les cellules bactériennes en croissance.

Cette relation entre la biogénèse des membranes et la biosynthèse des lipides membranaires est évidente dans les tissus en survie. La généralisation de ces observations à des organes en croissance de la même plante ou à des tissus d'autres plantes renforce l'intérêt du processus de survie. La survie peut être considérée comme une véritable *modèle biologique* permettant à l'expérimentateur de déclencher et de diriger à sa guise *les biosynthèses nouvelles des constituants essentiels des membranes cellulaires*.

o

o

o

B I B L I O G R A P H I E

- ADAMSON D., 1962 - Expansion and division in auxin-treated plant cells, *Canad. J. Bot.*, 40, 719-744.
- AHMED K. et SCHOLEFIELD P. G., 1960 - Effects of fatty acids on the ^{32}P -adenosine triphosphate exchange reaction in rat liver mitochondria, *Nature*, 186, 1046-1047.
- AKIYAMA M. et SAKAGAMI T., 1969 - Exchange of mitochondrial lecithin and cephalin with those in rat liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 187, 105-112.
- APREES T., 1966 - Evidence for the widespread occurrence of induced respiration in slices of plant tissues, *Australian J. Biol. Sci.*, 19, 981-990.
- APREES T. et BEEVERS H., 1960 - Pentose phosphate as a major component of induced respiration of carrot and potato slices, *Plant Physiol.*, 35, 839-847.
- APREES T. et BRYANT J.A., 1971 - Effect of cycloheximide on protein synthesis and respiration in disks of carrot storage tissue, *Phytochemistry*, 10, 1183-1190.
- ARTSCHWAGER E., 1924 - Studies on the potato tuber, *J. Agric. Res.*, 27, 809-837.
- ARTSCHWAGER E., 1927 - Wound periderm formation in the potato as affected by temperature and humidity, *J. Agric. Res.*, 35, 995-1000.
- ASAHI T., HONDA Y. et URITANI I., 1966 - Increase of mitochondrial fraction in sweet potato tissue after wounding or infection with *Ceratocystis fimbriata*, *Plant Physiol.*, 41, 1179-1184.
- ASAHI T. et MAJIMA R., 1969 - Effect of antibiotics on biogenesis of mitochondria during ageing of sliced sweet potato tuber root tissue, *Plant Cell Physiol.*, 10, 317-325.
- ASHWELL M.A. et WORK T.S., 1968 - Contrasting effects of cycloheximide on mitochondrial protein synthesis *in vivo* and *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 32, 1006-1012.
- ASHWELL M.A. et WORK T.S., 1970 - The biogenesis of mitochondria, *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 291-322.
- ATTARDI B., CRAVIOTO B. et ATTARDI G., 1969 - Membrane-bound ribosomes in Hela cells. I - Their proportion to total cell ribosomes and their association with messenger RNA, *J. Mol. Biol.*, 44, 47-70.
- AUDERSET G., 1972 - Communication personnelle.
- BABA S., 1958 - Histochemical studies of wound periderm formation IV changes in activity of phenol oxidases, *Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto. ser. B.*, 35, 63-68.
- BADDELEY M.S. et HANSON J.B., 1967 - Uncoupling of energy linked functions of corn mitochondria by linoleic acid and monomethydecenylsuccinic acid, *Plant Physiol.*, 42, 1702-1710.
- BAKER N. et LYNEN F., 1971 - Factors involved in fatty acyl CoA desaturation by fungal microsomes. The relative roles of acyl CoA and phospholipids as substrates, *European J. Biochem.*, 19, 200-226.

- BALIGA B.S., COHEN S.A. et MUNRO H.N., 1970 - Effect of cycloheximide on the reaction of puromycin with polysome bound peptidyl-tRNA, *FEBS Letters*, 8, 249-252.
- BARKER J.E., ELFVIN L.G., BIALE J.B. et HONDA S.J., 1968 - Studies on ultra-structure and purification of isolated plant mitochondria, *Plant Physiol.*, 43, 2001-2022.
- BARRON E.J., 1966 - The mitochondrial fatty acid synthesizing system. General properties and acetate incorporation into monoenoic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, 116, 425-440.
- BAUDHUIN P., 1969 - Peroxisomes in "Handbook of molecular cytology", Lima de Faria A. ed., North. Holland publ., p. 1179-1195.
- BEATTIE D.S., 1969 - The relationships of protein and lipid synthesis during the biogenesis of mitochondrial membranes, *J. Membrane Biol.*, 1, 383-401.
- BEATTIE D.S., PATTON G.M. et STUCHELL R.N., 1970 - Studies *in vitro* on amino acid incorporation into purified components of rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 245, 2171-2184.
- BEAUFAY H. et DUVE C., 1954 - Le système hexose-phosphatasique VI - Essais de démembrement des microsomes porteurs de glucose-6-phosphatase, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 36, 1551-1568.
- BEHNKE O., Helical arrangement of ribosomes in the cytoplasm of differentiating cells of the small intestine of rat foetuses, *Exp. Cell. Res.*, 30, 597-598.
- BEN ABDELKADER A., 1966 - La lipogénèse dans les mitochondries du parenchyme de Pomme (*Pirus malus L.*), Thèse de 3^e Cycle, *Phys. Vég. Fac. Sci. Paris*, 84 pp.
- BEN ABDELKADER A., 1968 - La lipogénèse dans le tubercule de Pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) I. Analyse et biosynthèse des lipides dans le parenchyme central. Influence de la "survie" (ageing) de rondelles de parenchyme sur cette biosynthèse, *Physiol. Vég.*, 6, 417-422.
- BEN ABDELKADER A., 1969 - Influence de la "survie" (ageing) sur la biosynthèse des phospholipides dans les "microsomes" du tubercule de Pomme de terre, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 268, 2406-2409.
- BEN ABDELKADER A., 1971 - Localisation intracellulaire du site de biosynthèse des acides gras polyinsaturés dans le tubercule de Pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), *C. R. Acad. Sc. Paris*, 273, 71-74.
- BEN ABDELKADER A., 1972 - Désaturation *in vitro* de l'oléyl-coenzyme A par les microsomes isolés de tranches de tubercule de Pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), *C. R. Acad. Sc. Paris*, 275, 51-54.
- BEN ABDELKADER A. et MAZLIAK P., 1965 - Les lipides des particules mitochondriales de Pomme, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 264, 1162-1165.
- BEN ABDELKADER A., CATESSON A.M., MAZLIAK P., THIBAUDIN A. et TREMOLIERES A., 1968 - Renouvellement des lipides dans diverses fractions cellulaires végétales, *Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég.*, 14, 3, 323-349.
- BEN ABDELKADER A. et MAZLIAK P., 1968 - Influence de la "survie" (ageing) sur la biosynthèse des phospholipides dans les cellules entières ou les mitochondries du tubercule de Pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), *C. R. Acad. Sc. Paris*, 267, 609-612.
- BEN ABDELKADER A. et MAZLIAK P., 1969 - Echanges, *in vitro*, de phospholipides entre mitochondries, microsomes et surnageant cytoplasmique de cellules de Pomme de terre, *C. R. Acad. Sc., Paris*, 269, 697-700.

- BEN ABDELKADER A., MAZLIAK P. et CATESSON A.M., 1969 - Biogénèse des lipides mitochondriaux au cours de la "survie" (ageing) des disques de parenchyme de tubercule de Pomme de terre, *Phytochemistry*, 8, 1121-1137.
- BEN ABDELKADER A. et MAZLIAK P., 1970 - Echanges de lipides entre mitochondries, microsomes et surnageant cytoplasmique de cellules de Pomme de terre ou de Chou-fleur, *European J. Biochem.*, 15, 250-262.
- BEN ABDELKADER A. et MAZLIAK P., 1971 - Renouvellement des lipides dans diverses fractions cellulaires de parenchyme de Pomme de terre ou d'inflorescences de Chou-fleur, *Physiol. Vég.*, 9, 227-240.
- BEN ABDELKADER A. et AUDERSET G., 1972 - Formation des polyribosomes dans des tranches de tubercule de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) maintenues en "survie", *C. R. Acad. Sc. Paris*, 274, 1311-1314.
- BEN ABDELKADER A., CHERIF A., DEMANDRE C. et MAZLIAK P., 1972 - The oleyl-coenzyme A desaturase of potato tubers : enzymatic properties, intracellular localization and induction during "aging" of tuber slices, *European J. Biochem.*, sous presse.
- BENNET-CLARK T.A. et BEXON D., 1943 - Water relations of plant cells. III - The respiration of plasmolyzed tissues, *New Phytol.*, 42, 65-92.
- BEN-SHAUL Y., EPSTEIN H.T. et SCHIFF S.A., 1965 - Studies on chloroplast development in *Euglena*. 10 - The return of the chloroplast to the proplastid condition during dark adaptation, *Canad. J. Bot.*, 43, 129-136.
- BENSON A.A. et STRICKLAND E.H., 1960 - Plant phospholipids III. Identification of diphosphatidylglycerol, *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 328-333.
- BERNHARD W., GAUTIER A. et ROUILLER C., 1954 - La notion de "microsomes" et le problème de la basophilie cytoplasmique. Etude critique et expérimentale, *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp.*, 43, 236-275.
- BIALE J.B., YANG S.F. et BENSON A.A., 1966 - Lipids in plant mitochondria, *Fed. Proc.*, 25, p. 405.
- BIELESKI R.L. et LATIES G.G., 1963 - Turnover rates of phosphate esters in fresh and aged slices of potato tuber tissue, *Plant Physiol.*, 38, 586-594.
- BIRNSTIEL M.L., CHIPCHASE M.I.H. et HYDE B.B., 1963 - The nucleolus, a source of ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 454-462.
- BISHOP D.G. et SMILLIE R.M., 1970 - The effect of chloramphenicol and cycloheximide on lipid synthesis during chloroplast development in *Euglena gracilis*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 139, 179-189.
- BLIGH E.G. et DYER W.J., 1959 - A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- BLOBEL G. et POTTER R.V., 1967 - Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver II. Interactions of ribosomes and membranes, *J. Mol. Biol.*, 26, 293-301.
- BLOCH R., 1941 - Wound healing in higher plants, *Bot. Rev.*, 7, 110-146.
- BLOK M.C., WIRTZ K.W.A. et SCHERPHOF G.L., 1971 - Exchange of phospholipids between microsomes and inner and outer mitochondrial membranes of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 61-75.
- BLOOMFIELD D.K. et BLOCH K., 1960 - The formation of A9- unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, 235, 337-345.
- BOEHM J., 1887 - Uber die respiration der Kartoffel, *Bot. Zeit.*, 45, 671-675.

- BORST P., KROON A.M. et RUTTENBERG G.J.C.M., 1967 - Mitochondrial DNA and other forms of cytoplasmic DNA in *Genetic elements, properties and function*, SHUGAR D. ed., Academic Press, Londres et Varsovie, p. 81-102.
- BOSMANN H.B., HAGOPIAN A. et EYLAR E.H., 1969 - Cellular membranes : the biosynthesis of glycoprotein and glycolipid in Hela cell membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 573-583.
- BRADSHAW M.J. et EDELMAN J., 1969 - Enzyme formation in higher plant tissue. The production of a gibberellin preceding invertase synthesis in aged tissue, *J. Exp. Bot.*, 20, 87-93.
- BRADSHAW M.J., CHAPMAN J.M. et EDELMAN J., 1970 - Enzyme formation in higher plant tissue. A protein inhibitor of invertase synthesis secreted by tissue slices of plant storage organs, *Planta*, 30, 323-332.
- BRENNER P.R. et PELUFFO R.O., 1969 - Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. I. Effect of unsaturated fatty acids of 18 carbons on the microsomal desaturation of linoleic acid into α -linolenic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 471-479.
- BURTON W.G., 1950 - Studies on the dormancy and sprouting of potatoes. I. The oxygen content of the potato tuber, *New Phytol.*, 49, 121-134.
- BURTON W.G., 1965 - The permeability to oxygen of the periderm of the potato tuber, *J. Exp. Bot.*, 16, 16-23.
- BURTON D. et STUMPF P.K., 1966 - Fat metabolism in higher plants XXXII - Control of plant acetyl CoA carboxylase activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 604-614.
- BURTON D.N., COLLINS J.M. et PORTER J.W., 1969 - Biosynthesis of the fatty acid synthetase by isolated rat liver cells, *J. Biol. Chem.*, 244, 1076-1077.
- BUTTERWORTH P.H.W., GUCHHAJI R.B., BAUM H., OLSON E.B., MARGOLIS S.A. et PORTER J.W., 1966 - Relationship between nutritional status and fatty acid synthesis by microsomal and soluble enzymes of pigeon liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 453-457.
- BUVAT R. et LANCE A., 1958 - Evolution des infrastructures des mitochondries au cours de la différenciation cellulaire, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 247, 1130-1132.
- BYGRAVE F.L., 1969 - Studies on the biosynthesis and turnover of the phospholipid components of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 244, 4768-4772.
- BYGRAVE F.L. et BUCHER Th., 1968 - Synthesis *in vivo* of the lecithin component of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria, *FEBS Letters*, 1, 42-45.
- CAPORALLI L., 1959 - Recherches sur les infrastructures des cellules radicales de *Lens culinaris* L. et particulièrement sur l'évolution des leucoplastes, *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 20, 215-247.
- CARLIER G., CHATAIN G., DIMIER M., LAVERDURE C. et LETAN D., 1972 - Evolution de l'aptitude à absorber le glucose- ^{14}C (U) au cours de la survie de disques foliaires de *Pelargonium zonale*, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 274, 1481-1484.
- CASTELFRANCO P.A., WEN JING TANG et BOLAR M.L., 1971 - Membrane transformation in aging potato tuber slices, *Plant Physiol.*, 48, 795-800.
- CATESSON A.M., 1970 - Evolution des plastes de Pomme au cours de la maturation du fruit. Modifications ultrastructurales et accumulation de ferritine, *J. Microsc.*, 9, 949-974.

- CATESSON A.M., - Communication personnelle.
- CHANCE B. et WILLIAMS G.R., 1955 - A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation, *Nature*, 176, 250-254.
- CHAPMAN J.M. et EDELMAN J., 1967 - Relationship between protein synthesis in tuber disks and the protein synthesis activity of a cell-free preparation, *Plant Physiol.*, 42, 1140-1146.
- CHAPMAN D. et WALLACH D.F.H., 1968 - Recent physical studies of phospholipids and natural membranes in "*Biological membranes*", CHAPMAN D. ed., Academic Press, Londres et New York, p. 125-202.
- CHAPMAN D. et LESLIE R.B., 1970 - Structure and function of phospholipids in membranes in "*Membranes of mitochondria and chloroplasts*", RACKER E. ed., Van Nostrand, New York, p. 91-126.
- CHERIF A. et BEN ABDEIKADER A., 1970 - Analyse quantitative des acides gras présents dans différentes régions du tubercule de Pomme de terre ; variation au cours de la conservation à 10°C, *Potato Research*, 13, 284-295.
- CHERIF A., 1971 - Levée de dormance du tubercule de Pomme de terre. Effet sur la lipogénèse, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 272, 242-245.
- CHERIF A., 1972 - Métabolisme des lipides dans le tubercule de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) en conservation et dans des tranches de tubercules en survie. Effets comparés de traitements variés, Université Paris VI, Thèse Doctorat Spécialité, 94 pp.
- CHERRY I.H., 1968 - Regulation of invertase in washed sugar beet tissue in "*Biochemistry and Physiology of plant growth substances*", WIGHTMAN F. et SETTERFIELD G. ed., The Runge Press, Ottawa, p. 417-431.
- CHEVILLARD L., HAMON F., MAYER A. et PLANTEFOL L., 1930 - Action de l'oxygène libre sur la respiration des tissus végétaux aériens, *Ann. Physiol.*, 6, 464-505.
- CHLAPOWSKI F.J. et BAND R.N., 1971a - Assembly of lipids into membranes in *Acanthamoeba palestinensis* L. I- Observations on the specificity and stability of choline-¹⁴C and glycerol -³H as labels for membrane phospholipids, *J. Cell Biol.*, 50, 625-633.
- CHLAPOWSKI F.J. et BAND R.N., 1971b - Assembly of lipids into membranes in *Acanthamoeba palestinensis* L. II- The origin and fate of glycerol-³H-labelled phospholipids of cellular membranes, *J. Cell Biol.*, 50, 634-651.
- CHRISPEELS M.J., VATTER A.E. et HANSON J.B., 1966 - Morphological development of mitochondria during cell elongation in the roots of *Zea mays* seedlings *J. Roy Microscop. Soc.*, 85, 29-44.
- CLARK-WALKER G.D. et LINNANE A.W., 1966 - *In vivo* differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 25, 2-14.
- CLARK-WALKER G.D. et LINNANE A.W., 1967 - The biogenesis of mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* : A comparison between cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeast and chloramphenicol - inhibited wild type cells, *J. Cell Biol.*, 34, 1-14.
- CLAUDE A., 1946 - Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. I. Problems, methods and preparation of extracts, *J. Exp. Med.*, 84, 51-59.

- CLICK R.E. et HACKETT D.P., 1963 - The role of protein and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices, *Proc. nat. Acad. Sc. U.S.*, 50, 243-250.
- CLICK R.E. et HACKETT D.P., 1966 - Evidence that the two ribosomal RNA species of plant tissue are synthesized on different genetic loci, *J. Mol. Biol.*, 17, 279-284.
- CLICK R.E. et HACKETT D.P., 1967 - Functional stability of messenger RNA in potato tuber slices, *Biochim. Biophys. Acta*, 142, 403-409.
- COTRUFO C. et LUNSETTER P., 1964 - The fatty acids of potato tubers (*Solanum tuberosum*), *Am. Potato J.*, 41, 18-22.
- COTTE-MARTINON M., DIANO M., MEUNIER D. et DUCET G., 1969 - Etude de diverses fractions cellulaires dans le tubercule de Pomme de terre au cours de la survie. Première partie : oxydations respiratoires et composition en cytochromes, *Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég.*, 15, 279-295.
- COULOMB P., 1969 - Etude de diverses fractions cellulaires dans le tubercule de Pomme de terre au cours de la survie. Deuxième partie : observations au microscope électronique, *Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég.*, 15, 297-315.
- COUTREZ-GEERINCK D., 1970 - Réponse respiratoire de disques de tubercule de *Solanum tuberosum* L. aux régulateurs vitaux présents dans leur partie centrale, *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 103, 225-241.
- CRIDDLE R.S. et SCHATZ G., 1969 - Promitochondria of anaerobically grown yeast I. Isolation and biochemical properties, *Biochemistry*, 8, 322-334.
- DALGARNO L. et BIRT L.M., 1963 - Free fatty acids in carrot tissue preparations and their effect on isolated carrot mitochondria, *Biochem. J.*, 87, 586-596.
- DALLNER G., SIEKEVITZ P. et PALADE G., 1965 - Synthesis of microsomal membranes and their enzymic constituents in developing rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 20, 135-142.
- DALLNER G., SIEKEVITZ P. et PALADE G.E., 1966a - Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. I- Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte, *J. Cell Biol.*, 30, 73-96.
- DALLNER G., SIEKEVITZ P. et PALADE G.E., 1966b - Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. II- Synthesis of constitutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte, *J. Cell Biol.*, 30, 97-117.
- DALLNER G. et ERNSTER L., 1968 - Subfractionation and composition of microsomal membranes : a review, *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 611-632.
- DAVIES E. et MACLACHLAN G.A., 1969 - Generation of cellulase activity during protein synthesis by pea microsomes *in vitro*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 581-587.
- DAVIS B.B., 1969 - Use of antibiotics in the study of ribosome action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 11-17.
- DAWSON R.M.C., 1966 - The metabolism of animal phospholipids and their turnover in cell membranes, *Assays in Biochem.*, 2, 69-115.
- DAWSON R.M.C., 1967 - Analysis of phosphatids and glycolipids by chromatography of their partial hydrolysis or alcoholysis products in "Lipid chromatographic analysis", MARINETTI G.V. ed., Interscience, New York, p. 163 - 189.

- DE DUVE C. et BAUDHUIN P., 1966 - Peroxysomes (microbodies and related particles), *Physiol. Rev.*, 46, 323-357.
- DE KLOET S.R., 1966 - Effect of actidione on the synthesis of RNA in *Saccharomyces carlsbergensis*, *Biochem. J.*, 99, 566-581.
- DE MAN J.C.H. et NOORDUYN N.J.A., 1969 - Ribosomes : properties and function in *Handbook of molecular cytology*, LIMA DE FARIA A. ed., North Holland publ. Co., p. 1079-1100.
- DEMANDRE C., 1971 - *Influence de la pression osmotique sur la lipogénèse dans des tranches de tubercule de Pomme de terre maintenues en survie*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris VI, 42 pp.
- DEVAUX H., 1891 - Etude expérimentale sur l'aération des tissus massifs, *Ann. Sci. Nat.*, 7, 297-395.
- DEVOR K.A. et MUDD J.B., 1971a - Biosynthesis of phosphatidylcholine by enzyme preparations from spinach leaves, *J. Lipid Res.*, 12, 403-411.
- DEVOR K.A. et MUDD J.B., 1971b - Control of fatty acid distribution in phosphatidylcholine of spinach leaves, *J. Lipid Res.*, 12, 412-419.
- DOUADY D., MAZLIAK P. et CATESSON A.M., 1972 - Conservation à très basse température de mitochondries isolées de Chou-fleur (*Brassica oleracea*, var. *botrytis*), *C. R. Acad. Sc. Paris*, 274, 2167-2170.
- DOUCE R., 1964 - Identification et dosage de quelques glycérophosphatides dans des souches normales et tumorales de Scorsonère cultivées *in vitro*, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 259, 3066-3068.
- DOUCE R., 1970 - *Le diphosphatidylglycérol des végétaux supérieurs : structure, localisation, métabolisme*, Thèse Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Paris, 161 pp.
- DUCET G., 1966 - Fractionnement cellulaire de feuilles par centrifugation en gradient de densité, *Ann. Physiol. Vég.*, 1, 19-29.
- DUCET G., Communication personnelle.
- DUCET G. et VANDEWALLE G., 1959 - Nouvelles techniques de dosage du phosphore, *Ann. Physiol. Vég.*, 2, 199-206.
- DUCET G., COTTE-MARTINON M., COULOMB P., DIANO M. et MEUNIER D., 1970 - Les mitochondries du tubercule de Pomme de terre, *Physiol. Vég.*, 8, 35-54.
- EDELMAN J. et HALL M.A., 1965 - Enzyme formation in higher plant tissues. Development of invertase and ascorbic acid oxidase activities in mature storage tissues of *Helianthus tuberosus* L., *Biochem. J.*, 95, 403-410.
- ELLIS R.J. et MAC DONALD I.R., 1967 - Activation of protein synthesis by microsomes from ageing beet disks, *Plant Physiol.*, 42, 1297-1302.
- ELLIS R.J. et MAC DONALD I.R., 1968 - Characterization of amino acid incorporation by subcellular fractions from sterile beet disks, *Planta*, 83, 248-256.
- ELLIS R.J. et MAC DONALD I.R., 1970 - Specificity of cycloheximide in higher plant systems, *Plant Physiol.*, 46, 227-232.
- EYTAN G. et OHAD I., 1970 - Biogenesis of chloroplast membranes. VI- Cooperation between cytoplasmic and chloroplast ribosomes in the synthesis of photosynthetic lamellar proteins during the greening process in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* γ -1, *Plant Physiol.*, 245, 4297-4307.
- FIRKIN F.C. et LINNANE A.W., 1968 - Differential effects of chloramphenicol on the growth and respiration of mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 32, 398-407.

- FLEISCHER S., KLOUWEN H. et BRIERLEY G., 1961 - Studies of the electron transfer system. XXXVIII- Lipid composition of purified enzyme preparation derived from beef heart mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 236, 2936-2941.
- FOLCH J., LEES M. et LOANE STANLEY G.M., 1957 - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- FORD J.M., KLOMPARENS W. et HAMNER C.L., 1958 - Cycloheximide (acti-dione) and its agricultural uses, *Plant Disease Report*, 42, 680-695.
- FOWKE L. et SETTERFIELD G., 1968 - Cytological responses in Jerusalem artichoke tuber slices during ageing and subsequent auxin treatment in *Biochemistry and Physiology of plant growth substances*, WIGHTMAN F. et SETTERFIELD G., ed., The Runge Press, Ottawa, p. 581-602.
- FREY-WYSSLING A. et MUHLETHALER K., 1965 - *Ultrastructural plant cytology*, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 377 p.
- GALLIARD T., 1968 - Aspects of lipid metabolism in higher plants. I- Identification and quantitative determination of the lipids in potato tubers, *Phytochemistry*, 7, 1907-1914.
- GALLIARD T., 1970 - The enzymic breakdown of lipids in potato tuber by phospholipids and galactolipid acyl hydrolase activities and by lipooxygenase, *Phytochemistry*, 9, 1725-1734.
- GALLIARD T., 1971a - Enzymic deacylation of lipids in plants. The effects of free acids on the hydrolysis of phospholipids by the lipolytic acyl hydrolase of potato tubers, *European J. Biochem.*, 21, 90-98.
- GALLIARD T., 1971b - The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers, *Biochem. J.*, 121, 379-390.
- GALLIARD T. et HAWTHORNE J.N., 1963 - Rapid incorporation of ^{32}P into diphosphoinositide of liver mitochondria, *Biochem. J.*, 88, 38-39.
- GALLIARD T. et STUMPF P.K., 1968 - Radioactive long-chain S-acyl coenzyme A (enzymatic preparation) in *Biochemical preparations*, LANDS W.E.M. ed., Wiley and Sons, New-York, p. 66-69.
- GALLIARD T., RHODES M.J.C., WOOLTORTON L.S.C. et HULME A.C., 1968 - Metabolic changes in excised fruit tissue. II- The development of a lipid synthesizing system during the ageing of peel disks from pre-climacteric apples, *Phytochemistry*, 7, 1453-1464.
- GARBUS J., DELUCA H.F., LOOMANS M.E. et STRONG F.M., 1963 - The rapid incorporation of phosphate into mitochondrial lipids, *J. Biol. Chem.*, 238, 59-63.
- GARDNER H.W., 1968 - Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl-diglycerides by thin layer chromatography, *J. Lipid Res.*, 9, 139-141.
- GETZ G.S., BARTLEY W., STIRPE F., NOTTON B.M. et RENSHAW A., 1962 - The lipid composition of rat liver mitochondria, fluffy layer and microsomes, *Biochem. J.*, 83, 181-191.
- GIBSON D.M., HICKS S.E. et ALLMANN D.W., 1967 - Adaptive enzyme formation during hyperlipogenesis, *Advances in enzyme regulation*, 4, 239-246.
- GLAUMANN H., 1971 - Synthesis and intracellular transport of macromolecules and small molecules in the liver cells, *Chem. Biol. Interactions*, 3, p. 268.
- GOLDBLATT P.J., VERBIN R.S. et SULLIVAN R.J., 1970 - Induction of nucleolar segregation by actinomycin D following inhibition of protein synthesis with cycloheximide, *Exp. Cell Res.*, 63, 117-123.

- GOODMAN H.M. et RICH A., 1963 - Mechanism of polyribosome action during protein synthesis, *Nature*, 199, 318-322.
- GORNALL A.G., BARDAWILL C.J. et DAVID M.M., 1949 - Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.*, 177, 751-776.
- GREEN D.E. et FLEISCHER S., 1963 - Role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta library*, 1, 325-345.
- GREEN D.E. et TZAGOLOFF A., 1966 - Role of lipids in the structure and function of biological membranes, *J. Lipid Res.*, 7, 587-607.
- GRELLET F., JULIEN R. et GUITTON Y., 1969 - Quelques aspects de la synthèse protéique chez *Raphanus sativus* L. au cours de la germination, *Physiol. Vég.*, 7, 415-424.
- GRENIER G., TREMOLIERES A., THERRIEN H.P. et WILLEMOT C., 1972 - Changements dans les lipides de la Luzerne en conditions menant à l'endurcissement au froid, *Canad. J. Bot.*, sous presse.
- GROSBOIS M., 1971 - Biosynthèse des acides gras au cours du développement du fruit et de la graine du Lievre, *Phytochemistry*, 10, 1261-1273.
- GUILLOT-SALOMON T., 1972 - Variations de l'ultrastructure de mitochondries isolées de tissus végétaux, en fonction de la tonicité du milieu de suspension, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 274, 869-871.
- GURR M.I., BRINDLEY D.N. et HUBSCHER G., 1965a - Metabolism of phospholipids. Biosynthesis of phosphatidylcholine in the intestinal mucosa, *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 486-500.
- GURR M.I., PROTTEY C. et HAWTHORNE J.N., 1965b - The phospholipids of liver-cell fractions. II- Incorporation of (^{32}P) orthophosphate *in vivo* in normal and regenerating rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 357-370.
- GURR M.I., ROBINSON M.P., SVORD R.W. et JAMES A.T., 1968 - On the tight coupling of phospholipid synthesis and fatty acid desaturation in *Chlorella vulgaris* L., *Biochem. J.*, 110, 49p.
- GURR M.I., ROBINSON M.P. et JAMES A.T., 1969 - The mechanism of formation of polyunsaturated fatty acids by photosynthetic tissue. The tight coupling of oleate desaturation with phospholipid synthesis in *Chlorella vulgaris* L., *European J. Biochem.*, 9, 70-78.
- HACKENBROCK C.R., 1966 - Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I- Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria, *J. Cell Biol.*, 30, 269-297.
- HACKETT D.P., 1956 - Studies on the "wound respiration" of potato tuber tissue, *Plant Physiol.*, 31, Suppl., xl.
- HACKETT D.P. et HAAS D.N., 1958 - Changes in the respiratory chain during incubation of potato tuber slices, *Plant Physiol.*, 33, Suppl., vii.
- HACKETT D.P., HAAS D.W., GRIFFITHS S.K. et NIEDERPRUEM D.J., 1960 - Studies on the development of cyanide resistant respiration in potato tuber slices, *Plant Physiol.*, 37, 8-19.
- HACKNEY F.M.V., 1945 - Studies on the metabolism of apples. VI-Preliminary investigations on the respiration of sliced apple tissue. *Proc. Linnean Soc. N.S. Wales*, 70, 333-345.
- HADDER J.C. et WILSON G.B., 1958 - Cytological assay of c-mitotic and prophase poison action, *Chromosoma*, 9, 91-104.

- HAJRA A.K., SEGUIN E.P. et AGRANOFF B.W., 1968 - Rapid labelling of mitochondrial lipids by labelled orthophosphate and adenosine triphosphate, *J. Biol. Chem.*, 243, 1609-1616.
- HARDESTY B., MILLER R. et SCHWEET R., 1963a - Polyribosome breakdown and hemoglobin synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sc. US*, 50, 924-931.
- HARDESTY B., HUTTON J., ARLINGHAUS R. et SCHWEET R., 1963b - Polyribosome formation and hemoglobin synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sc. US*, 50, 1078-1085.
- HARPER A.E., 1965 - Glucose-6-phosphate in *Methods of enzymatic analysis*, BERGMAYER H.U. ed., Acad. Press, New-York, p. 788-792.
- HARRIS R.V., JAMES A.T. et HARRIS P., 1967 - Synthesis of unsaturated fatty acids by green algae and plant leaves in "*Biochemistry of chloroplasts*" vol. II, GOODWIN T.W. ed., Academic Press, London et New-York, p. 241-253.
- HAWTHORNE M.E. et WILSON G.B., 1952 - The cytological effects of the antibiotic actidione, *Cytologia*, 17, 71-85.
- HEINSTEIN P. et STUMPF P.K., 1969 - Fat metabolism in higher plants XXXVIII Properties of wheat germ acetyl coenzyme A carboxylase, *J. Biol. Chem.*, 244, 5374-5381.
- HENDERSON T.O. et McNEIL J.J., 1966 - The control of fatty acid synthesis in *Lactobacillus plantarum*, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 25, 662-669.
- HEPLER P.K. et NEWCOMB E.H., 1967 - Fine structure of cell plate formation in the apical meristem of *Phaseolus* roots, *J. Ultrastructural Res.*, 19, 498-513.
- HICKS S.E., ALLMANN D.W. et GIBSON D.M., 1965 - Inhibition of hyperlipogenesis with puromycine and actinomycin D, *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 441-444.
- HOPKINS E.F., 1927 - Variation in sugar content in potato tubers caused by wounding and its possible relation to respiration, *Bot. gaz.*, 84, 75-88.
- HULME A.C., RHODES M.J.C., GALLIARD T. et WOOLTORTON L.S.C., 1968 - Metabolic changes in excised fruit tissue IV- Changes occurring in disks of apple peel during the development of the respiration climacteric, *Plant Physiol.* 43, 1154-1161.
- HULSMANN W.C., ELLIOTT W.B. et SLATER E.C., 1960 - The nature and mechanism of action of uncoupling agents present in mitochondria preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 267-276.
- HULTIN T., 1961 - Activation of ribosomes in sea urchin eggs in response to fertilization, *Exp. Cell. Res.*, 25, 405-417.
- HUXLEY H.H. et ZUBAY G., 1960 - Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 2, 10-18.
- JACHYMCZYK W.J. et CHERRY J.H., 1968 - Studies on messenger RNA from peanut plants : *in vitro* polyribosome formation, *Biochim. Biophys. Acta*, 157, 368-377.
- JACKMAN M.E. et VAN STEVENINK R.F.M., 1967 - Changes in the endoplasmic reticulum of beetroot slices during aging, *Aust. J. Biol. Sc.*, 20, 1063-1068.
- JACOBSON B.S., LATIES G.S., SMITH B.N., EPSTEIN S. et LATIES B., 1970 - Cyanide-induced transition from endogenous carbohydrate to lipid oxidation as indicated by the carbon-13 content of respiratory CO₂, *Biochim. Biophys. Acta*, 216, 295-304.
- JACOBY B. et SUTCLIFFE J.F., 1962 - Effects of chloramphenicol on the uptake and incorporation of amino-acids by carrot root tissue, *J. Exp. Bot.*, 13, 335-347.

- JAMES A.T., 1962 - The biosynthesis of unsaturated fatty acids in isolated plant leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, 57, 167-169.
- JAMES W.O. et BEEVERS H., 1950 - The respiration of *Arum spadix*. A rapid respiration, resistant to cyanide, *New Phytol.*, 49, 353-374.
- JOHNSTONE G.R., 1925 - Effect of wounding on respiration and exchange of gases, *Bot. gaz.*, 79, 339-340.
- JOLIVET E., 1970 - Métabolisme des acides organiques et des acides aminés libres dans le tubercule de Pomme de terre au cours de la rupture provoquée de son repos végétatif par la "Rindite". II- Devenir du citrate dégradé et origine du succinate accumulé au cours des premiers jours qui suivent le traitement, *Physiol. Végét.*, 8, 475-487.
- JOLLIOT A., 1970 - Intervention des lipides dans l'activité de quelques enzymes de mitochondries de Chou-fleur, Diplôme d'Etudes Approfondies, Faculté des Sciences de Paris, 39 pp.
- JOLLIOT A. et MAZLIAK P., 1971 - Interventions des lipides dans l'activité de la NADH-cytochrome c réductase d'une fraction mitochondriale isolée d'inflorescences de Chou-fleur (*Brassica oleracea*, var. *botrytis* L.), *C. R. Acad. Sc. Paris*, 272, 246-249.
- JONES J.D. et HULME A.C., 1961 - Preparations of mitochondria from the peel of apples, *Nature*, 191, 370-372.
- JULIEN R., 1971 - Quelques aspects du métabolisme des macromolécules informatives au cours de la germination du Radis, Thèse Doctorat d'Etat, Centre Universitaire de Perpignan, 103 pp.
- JUNGALWALA F.B. et DAWSON R.M.C., 1970 - Phospholipid synthesis and exchange in isolated liver cells, *Biochem. J.*, 117, 484-490.
- KADENBACH B., 1968a- Incorporation of ^{32}P -phosphate into phosphatides of rat liver mitochondria *in vivo* and *in vitro*, *FEBS Letters*, 2, 118-120.
- KADENBACH B., 1968b - Transfer of proteins from microsomes into mitochondria : biosynthesis of cytochrome c in "Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria", SLATER E.C., TAGER J.M., PAPA S. et QUAGLIARIELLO E. ed., Adriatica. Bari, p. 415-429.
- KADENBACH B., 1969 - Biosynthesis of mitochondrial enzymes in "Mitochondria : Structure and function", ERNSTER L. et DRAHOTA Z. ed., FEBS symposium, 17, Acad. Press, Londres et New York, p. 179-188.
- KADENBACH B., 1970 - Biosynthesis of cytochrome c. The sites of synthesis of apoprotein and holoenzyme, *European J. Biochem.*, 12, 392-398.
- KAISER W., 1969 - Incorporation of phospholipid precursors into isolated rat liver mitochondria, *European J. Biochem.*, 8, 120-127.
- KAHL G., 1971a - Synthesis of rRNA, tRNA and other RNA-species concomitant with polyribosome formation in aging potato tuber slices, *Z. f. Naturforsch.*, 26, 1058-1064.
- KAHL G., 1971b - Activation of protein synthesis in aging potato tuber slices, *Z. f. Naturforsch.*, 26, 1064-1067.
- KARNOVSKY M.J., 1963 - The fine structure of mitochondria in the frog nephron correlated with cytochrome oxidase activity, *Exp. Mol. Pathol.*, 2, 347-366.
- KÁS J., HLADIK J. et SICHÓ V., 1969 - Study on metabolism of phospholipids in animal tissues, *European J. Biochem.*, 9, 348-352.
- KAVANAU J.L., 1965 - *Structure and function in biological membranes*, Holden Day Inc., San Francisco, 354-409, 760 pp.

- KIRK J.T.O., 1970 - Failure to detect effects of cycloheximide on energy metabolism in *Euglena gracilis*, *Nature*, 226, p.182.
- KIRK J.T.O. et TILNEY-BASSET R.A.E., 1967 - *The plastids*. Their chemistry, structure, growth and inheritance, FREEMAN W.H. and co, Londres, 608 pp.
- KOEHLER J.K., 1962 - Variation of yeast ribosomes with nutritional state, *Nature*, 194, 757-759.
- KOLATTUKUDY P.E. et REED D.J., 1966 - Metabolism of red beet slices. II- Effect of aging, *Plant Physiol.*, 41, 661-669.
- LAFONTAINE J.G. et LORD A., 1969 - Organization of nuclear structures in mitotic cells in "*Handbook of molecular cytology*", LIMA DE FARIA A. ed., North Holland, Pub. Amsterdam, p. 381-411.
- LAMB A.J., CLARK-WALKER C.D. et LINNANE A.W., 1968 - The biogenesis of mitochondria. 4- The differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems *in vitro* by antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta*, 161, 415-427.
- LANCE C., 1971 - Les mitochondries de l'inflorescence de Chou-fleur. I- Propriétés oxydatives, *Physiol. Végét.*, 9, 259-279.
- LANCE C. et BONNER W.D., 1968 - The respiratory chain components of higher plant mitochondria, *Plant Physiol.*, 43, 756-766.
- LANGE H., 1970 - Atmungswege bei vernarbenden und proliferierenden gewebefragmenten der Kartoffelknolle, *Planta*, 90, 119-132.
- LANGE H., KAHL G. et ROSENSTOCK G., 1970 - Enzymaktivitäten und intermediat Spiegel des glucosekatabolismus bei proliferierenden und suberin synthetisierenden speicherparenchymzellen von *Solanum tuberosum* L., *Planta*, 91, 18-31.
- LARSEN E.C., 1950 - Chlorophyll formation in potato tubers as affected by temperature and time, *Science*, 111, 206-207.
- LARSEN W.J., 1970 - Genesis of mitochondria in insect fat body, *J. Cell Biol.*, 47, 373-383.
- LATIES G.G., 1959 - The development and control of coexisting respiratory systems in slices of chicory root, *Arch. Biochem. Biophys.*, 79, 378-391.
- LATIES G.G., 1962 - Controlling influence of thickness on development and type of respiratory activity in potato slices, *Plant Physiol.*, 37, 679-690.
- LATIES G.G., 1964 - The relation of glucose absorption to respiration in potato slices, *Plant Physiol.*, 39, 391-397.
- LATIES G.G., 1967a - The inhibition of citrate, isocitrate and α -keto glutarate in aged potato slices by hydroxy-A-keto glutarate, *Phytochemistry*, 6, 181-186.
- LATIES G.G., 1967b - The onset of Tricarboxylic cycle activity with aging in potato slices, *Plant Physiol.*, 39, 654-663.
- LATIES G.G. et HOELLE C., 1965 - Malonate and cyanide insensitivity in relation to respiratory compensation in potato slices, *Plant Physiol.*, 40, 757-764.
- LATIES G.G. et HOELLE C., 1967 - The α oxydation of long chain fatty acids as possible component of the basal respiratory of potato slices, *Phytochemistry*, 6, 49-58.
- LEAVER G.G. et EDELMAN J., 1967 - Antibiotics as a mean of control of bacterial contamination of storage tissue disks, *Nature*, 297, 1000-1001.
- LEAVER C.J. et KEY J.L., 1967 - Polyribosome formation and RNA synthesis during aging of carrot root tissue, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 57, 1338-1344.

- LECHEVALLIER D., 1966 - Les lipides des Lemnacees, analyse des acides gras des lipides des frondes de *Spirodela polyrrhiza*, *C. R. Acad. Sc., Paris*, 263, 1849-1852.
- LEE S.G. et CHASSON R.M., 1966a - Aging and development of enhanced respiratory activity in potato tuber tissue, *Physiol. Plantarum*, 19, 194-198.
- LEE S.G. et CHASSON R.M., 1966b - Aging and mitochondrial development in potato tuber tissue, *Physiol. Plantarum*, 19, 199-206.
- LEHNINGER A.L., 1964 - *The mitochondrion. Molecular basis of structure and function*, Benjamin Inc., New York, 263pp.
- LEPAGE M., 1964 - The separation and identification of plant phospholipids and glycolipids by two dimensional thin-layer chromatography, *J. Chromatog* 13, 99-103.
- LEPAGE M., 1968 - The lipid components of white potato tubers (*Solanum tuberosum* L.), *Lipids*, 3, 477-481.
- LEVY M., TOURY R. et SAUNER M.T., 1969 - Recent findings on the biochemical and enzymatic composition of the two isolated mitochondrial membranes in relation to their structure, *FEBS Symposium*, 17, 33-42.
- LIN C.Y., KEY J.L. et BRACKER C.E., 1966 - Association of D-RNA with polyribosomes in the soybean root, *Plant Physiol.*, 41, 976-982.
- LIPETZ J., 1970 - Wound healing in higher plants, *Intern. Rev. of Cytology*, 27, 1-28.
- LORCH I.J. et JEON K.W., 1969 - Nucleoli damaged by actinomycin D, *Nature*, 221, 1073-1074.
- LOUGHMAN B.C., 1960 - Uptake and utilization of phosphate associated with respiratory changes in potato tuber slices, *Plant Physiol.*, 35, 418-424.
- LUZZATI V., TARDIEU A. et GULIK-KRZYWICKI T., 1968 - Polymorphism of lecithins, *Nature*, 218, 1031-1034.
- MAC DONALD I.R., 1967 - Oxygen tension a determining factor in the respiration of potato disks of varying thickness, *Plant Physiol.*, 42, 227-232.
- MAC DONALD I.R., DEKOCK P.C., 1958 - Temperature control and metabolic drifts in ageing disks of storage tissue, *Am. Botany N.S.*, 22, 429-448.
- MAC DONALD I.R. et LATIES G.G., 1962 - Kinetic studies of anion absorption by potato slices at 0°C, *Plant Physiol.*, 38, 38-44.
- MAC DONALD I.R., BACON J.S.D., VAUGHAN D.V. et ELLIS R.J., 1966 - The relation between ion absorption and protein synthesis in beet disks, *J. Exp. Bot.*, 17, 822-837.
- MAC DONALD I.R., ELLIS R.J., 1969 - Does cycloheximide inhibit protein synthesis specifically in plant tissues ?, *Nature*, 222, 791-792.
- Mc CAMAN R.E. et COOK K., 1966 - Intermediary metabolism of phospholipids in brain tissue. III- Phosphorylcholine glyceride-transferase, *J. Biol. Chem.* 241, 3390-3394.
- McMAHON V. et STUMPF P.K., 1964 - Synthesis of linoleic acid by particulate system from safflower seeds, *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 359-361.
- Mc MURRAY W.C. et DAWSON R.M.C., 1969 - Phospholipid exchange reactions within the liver cell, *Biochem.J.*, 112, 91-108.
- MACEY M.J.K. et STUMPF P.K., 1968 - Fat metabolism in higher plants. XXXVI- Long chain fatty acid synthesis in germinating peas, *Plant Physiol.*, 43, 1637-1647.

- MADEC P. et PERENNEC P., 1959 - Le rôle respectif du feuillage et du tubercule-mère dans la tuberisation de la Pomme de terre, *Eur. Potato J.*, 2, 22-49.
- MADISON M. et RAPPAPORT L., 1968 - Regulation of bud rest in tubers of potato, *Solanum tuberosum* L. V- Abscissic acid and inhibitors of nucleic acid and protein syntheses, *Plant and Cell Physiol.*, 9, 147-153.
- MANGOLD H.K., 1961 - Thin layer chromatography of lipids, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.* 38, 708-727.
- MANGOLD H.K., 1964 - Thin layer chromatography of lipids, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.* 41, 762-773.
- MARCUS A. et FEELEY J., 1965 - Protein synthesis in imbibed seeds. II- Polysome formation during imbibition, *J. Biol. Chem.*, 240, 1675-1680.
- MARGOLIS S., 1969 - Structure of very low and low density lipoproteins. In "Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems", TRIA E. et SCANU A.M. ed., Acad. Press, New York, p. 370-424.
- MARGULIES M.M. et BRUBAKER C., 1970 - Effect of chloramphenicol on amino acid incorporation by chloroplasts and comparison with the effect of chloramphenicol on chloroplast development *in vivo*, *Plant Physiol.*, 45, 632-633.
- MARINETTI G.V. et STOTZ E., 1956 - Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper, *Biochim. Biophys. Acta*, 21, 168-170.
- MARRE E., COCUCCHI S. et STURANI E., 1965 - On the development of the ribosomal system in the endosperm of germinating castor bean seeds, *Plant Physiol.*, 40, 1162-1170.
- MARTIN E.M. et MORTON R.K., 1956 - Enzymic and chemical properties of cytoplasmic particles from wheat roots, *Biochem. J.*, 64, 687-693.
- MARUO B. et BENSON A.A., 1958 - Cyclic glycerophosphate formation from the glycerophosphatides, *J. Biol. Chem.*, 234, 254-256.
- MARUYAMA K., 1965 - Cyclic changes of the golgi body during microsporogenesis in *Tradescantia paludosa*, *Cytologia* (Tokyo), 30, 354-374.
- MASUDA Y., 1966 - Auxin-induced growth of tuber tissue of Jerusalem artichoke. II- The relation to protein and nucleic acid metabolism, *Plant Cell Physiol.*, 7, 75-91.
- MATSUMOTO ZINZO, YOKIMIDE ISOGAI, HIDEO KANEKO, ATSUHIKO NAGAMOTO, YUTAKA KOSEKI, KISEI NISHIMURA, AKIRA YAMADA, SHOZO TAKAHASHI, HIDEJI SHIOZAKI, KENJI ICHIBA, MASAOKI KABIYA et HIROSHI ARIGA, 1962 - The effect of ATP on the lipid and carbohydrate metabolism. IV- Proceedings of the 26th annual meeting of Japanese circulation society, *Japanese Circ. Jour.*, 26, 1005-1043.
- MAZLIAK P., 1965 - Un matériel intéressant pour étudier la biosynthèse des acides gras insaturés : le parenchyme de Pomme (*Pirus malus* L), *C. R. Acad. Sc. Paris*, 261, 2716-2719.
- MAZLIAK P., 1968 - *Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures*, Masson, Paris, 223 pp.
- MAZLIAK P., 1971 - *Les membranes protoplasmiques*, Doin, Paris, 195 pp.
- MAZLIAK P., - Communication personnelle.
- MAZLIAK P., BEN ABDELKADER A. et CATESSON A.M., 1967 - Biosynthèse comparée des lipides par les cellules entières ou les mitochondries isolées du parenchyme de Pomme *Pirus malus* L., *Physiol. Végét.*, 5, 237-260.
- MAZLIAK P., STOLL U. et BEN ABDELKADER A., 1968 - Coopération entre les mitochondries et le reste de la cellule pour le renouvellement des lipides mitochondriaux du parenchyme de Pomme, *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 414-417.

- MAZLIAK P. et BEN ABDELKADER A., 1970 - La biosynthèse des lipides dans les mitochondries végétales, *Rev. Gén. Bot.*, 77, 53-71.
- MAZLIAK P. et BEN ABDELKADER A., 1971 - Echanges d'acides gras *in vitro* entre les mitochondries, microsomes et surnageants cytoplasmiques de cellules de Pomme de terre et de Chou-fleur, *Phytochemistry*, 10, 2879-2890.
- MAZLIAK P. OURSEL A., BEN ABDELKADER A. et GROSBOIS M., 1972 - Biosynthèse des acides gras dans les mitochondries végétales isolées, *European J. Biochem.*, 28, 399-411.
- METCALFE L.D., SCHMITZ A.A. et PELKA J.R., 1966 - Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis, *Anal. Chem.*, 38, 514-515.
- MICHIELS L., 1967 - Contribution à l'étude de l'action inhibitrice du rayonnement gamma sur la croissance des germes du tubercule de la Pomme de terre. Thèse Doctorat Université, Faculté des Sciences de Paris, 140 pp.
- MINARI O. et ZILVERSMIT D.B., 1963 - Behaviour of dof lymph chylomycron lipid constituents during incubation with serum, *J. Lipid Res.*, 4, 424-436.
- MOLLENHAUER H.H., 1965 - Transition forms of golgi apparatus secretion vesicles *J. Ultrastruct. Res.*, 12, 439-446.
- MOLLENHAUER H.H. et MORRE D.J., 1966 - Golgi apparatus and plant secretion, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17, 27-46.
- MORRE D.J., MOLLENHAUER H.H. et BRACKER C.E., 1971 - Origin and continuity of golgi apparatus in "Origin and continuity of cell organelles", REINERT J. et URSPRUNG H. ed., Springer-Verlag Pub., Berlin, p. 82-126.
- MORRE D.J., NYQUIST S. et RIVEIRA E., 1970 - Lecithin biosynthesis enzymes of onion stem and the distribution of phosphorylcholine-cytidyl transferase among cell fractions, *Plant Physiol.*, 45, 800-804.
- MORRIS L.J., WHARRY D.M. et HAMMOND W.E., 1967 - Chromatographic behaviour of isomeric long-chain aliphatic compounds. II- Argentation thin-layer chromatography of isomeric compounds, *J. Chromatog.*, 31, 69-76.
- MOULÉ Y., 1964 - Endoplasmic reticulum and microsomes of rat liver in "Cellular membranes in development, LOCKE M. ed., Acad. Press, New York and London, p. 97-127.
- MUDD J.B. et STUMPF P.K., 1961 - Fat metabolism in higher plants. XIV- Factors affecting the synthesis of oleic acid by particulate preparations from avocado mesocarp, *J. Biol. Chem.*, 10, 2602-2609.
- NAKANO M. et ASAHI T., 1970 - Biochemical studies on mitochondria formed during aging of slices potato tissue, *Plant Cell Physiol.*, 11, 499-502.
- NASS M.M.K., 1968 - Properties of organelle-associated and isolated mitochondrial DNA in "Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria", SLATER E.C., TAGER J.M., PAPA S. et QUAGLIARIELLO E. ed., Adriatica, Bari p. 27-69.
- NASS M.M.K. et NASS S., 1963 - Intramitochondrial fibers with DNA characteristics I- Fixation and electron staining reactions, *J. Cell Biol.*, 19, 593-611.
- NATHANS D., 1964 - Puromycin inhibition of protein synthesis : incorporation of puromycin into peptide chain, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 51, 585-592.
- NEAL W.K., HOFFMANN H.P. et BRICE C.A., 1971 - Sedimentation behavior and ultrastructure of mitochondria from repressed and derepressed yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant Cell Physiol.*, 12, 181-192.
- NEUPERT W. et LUDWIG G.D., 1971 - Sites of biosynthesis of outer and inner membrane proteins of *Neurospora crassa* mitochondria, *European J. Biochem.*, 15, 523-532.

- NICHOLS B.W., 1964 - Separation of plant phospholipids and glycolipids in "New Biochemical separations", JAMES A.T. and MORRIS L.J. ed., Van Nostrand, Princeton et New York, p. 324-337.
- NICHOLS B.W. et JAMES A.T., 1964 - The lipids of plant storage tissue, *Fette Seifen Anstrichmittel*, 66, 1003-1006.
- NICHOLS B.W., JAMES A.T. et BREUER J., 1967 - Interrelationships between fatty acid biosynthesis and acyl-lipid synthesis in *Chlorella vulgaris*, *Biochem. J.*, 104, 486-496.
- NOODEN L.O. et THIMANN K.V., 1963 - Evidence for a requirement of protein synthesis for auxin-induced cell enlargement, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 97-100.
- NOUGAREDE A., 1963 - Premières observations sur l'infrastructure et sur l'évolution des cellules de jeunes ébauches foliaires embryonnaires du *Tropaeo majus* L. I- Cytologie de la deshydratation de maturation, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 266, 1335-1338.
- NOZAWA Y. et THOMPSON G.A., 1971 - Studies of membrane formation in *Tetrahymena pyriformis*. III- Lipid incorporation into various cellular membranes of logarithmic phase cultures, *J. Cell Biol.*, 49, 722-730.
- OBRIG T.G., CULP W.J., Mc KEEHAN W.L. et HARDESTY B., 1971 - The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes, *J. Biol. Chem.*, 246, 174-181.
- PALADE G.E., 1953 - A small particulate component of the cytoplasm, *J. Appl. Phys.*, 24, p. 1419.
- PALADE G.E., 1956 - The endoplasmic reticulum, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 85-98.
- PALADE G.E. et SIEKEVITZ P., 1956 - Liver microsomes. An integrated morphological and biochemical study, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 171-200.
- PALMER J.M. et LOUGHMAN B.C., 1964 - Some factors affecting the rate of absorption and utilization of ions by stem segments, *New Phytol.*, 63, 217-231.
- PARISH R.W., 1968 - Studies on senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I- The effects of cutting and inhibition of nucleic-acid and protein synthesis, *Planta*, 82, 1-13.
- PARISI B. et CIFERRI O., 1966 - Protein synthesis by cell-free extracts from castor-bean seedlings, *Biochem.*, 5, 1638-1645.
- PARPART A.K. et BALLENTINE R., 1952 - Molecular anatomy of the red cell plasma membranes in *Modern trends in Physiology and Biochemistry*, BARRON E.S.G. ed., Academic Press, New-York, p. 135-148.
- PARSONS D.F., WILLIAMS G.R., THOMPSON W., WILSON R. et CHANCE B., 1967 - Improvements in the procedure for purification of mitochondrial outer and inner membrane in the smooth endoplasmic reticulum in "Mitochondrial structure and compartmentation", QUAGLIARIELLO E., SLATER E.C. et TAGER M. ed., Adriatica ed. Bari, p. 29-70.
- PASCAUD M., 1964 - Les phospholipides de la cellule hépatique. Interprétation fonctionnelle de leur renouvellement. II- Renouvellement des acides gras des phosphoglycérides, *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 528-537.
- PENKOV G., 1969 - Effect of certain nitrogen and phosphorus salts on the content of proteins, amino acids and nucleic acids in the regeneration of potato disks, *Dokl. Bulg. Akad. Nauk*, 22, 337-340.
- PETERMANN M.L., 1964 - *The physical and chemical properties of ribosomes*, Elsevier, Amsterdam, 258 pp.

- PLATTNER H. et SCHATZ G., 1969 - Promitochondria of anaerobically grown yeast. III- Morphology, *Biochem. J.*, 8, 339-343.
- PRIESTLEY J H. et WOFFENDEN L.M., 1923 - The healing of wounds in potato tubers and their propagation by cut sets, *Ann. Appl. Biol.*, 10, 96-115.
- QUARLES R.H. et DAWSON R.M.C., 1969 - The distribution of phospholipase D in developing and mature plants, *Biochem. J.*, 112, 787-794.
- RAFF R.A., 1970 - Induction of fatty acids synthesis in cultured mammalian cells. Effects of cycloheximide and X-rays, *J. Cell Physiol.*, 75, 345-352.
- RAPPAPORT L. et SACHS M., 1967 - Wound-induced gibberellins, *Nature*, 214, 1148-1150.
- REDMAN C.M. et SABATINI D.D., 1966 - Vectorial discharge of peptides released by puromycin from attached ribosomes, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 56, 608-615.
- REICH E., 1963 - Biochemistry of actinomycins, *Cancer Res.*, 23, 1428-1441.
- RHODES M.J.C., WOOLTORTON L.S.C., GALLIARD T. et HULME A.C., 1968 - Metabolic changes in excised fruit tissue. I- Factors affecting the development of a malate decarboxylation system during the ageing of disks of pre-climacteric apples, *Phytochemistry*, 7, 1439-1452.
- RICH A., WARNER J.R. et GOODMAN H.M., 1963 - The structure and function of polyribosomes, *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.*, 28, 269-285.
- RICHARDS H.M., 1896 - The respiration of wounded respiration, *Ann. Botany*, 10, 531-582.
- ROBERTSON R.N. et TURNER J.S., 1945 - Studies in the metabolism of plant cells. 3- The effects of cyanide on the accumulation of potassium chloride and on respiration ; the nature of the salt respiration, *Aust. J. Exp. Biol.*, 23, 63-73.
- ROMBERGER J.A. et NORTON G., 1961 - Changing respiratory pathways in potato tuber slices, *Plant Physiol.*, 36, 20-29.
- ROSE R.J., 1970 - The effect of cycloheximide on cell division in partially synchronized plant cells, *Australian J. Biol. Sci.*, 23, 573-583.
- ROSE R.J. et SETTERFIELD G., 1971 - Cytological studies on the inhibition by 5- fluorouracil of ribosome synthesis and growth in Jerusalem artichoke tuber slices, *Planta*, 101, 201-230.
- ROSENSTOCK G., 1963 - Physiologische und anatomische studien zur problem der wundheilung I. Untersuchungen über zusammenhänge zwischen dem wassergehalt verletzten kartoffelparenchyms und dessen vernarbungsreaktionen nebst bemerkungen zur theorie des wundreizes, *Beitr. Biol. Pflanzen*, 38, 275-319.
- ROUSER G., GALLI C., LIEBER E., BLANK M.L. et PRIVETT O.S., 1964 - Analytical fractionation of complex lipid mixtures : DEAE cellulose column chromatography combined with quantitative thin-layer chromatography, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.*, 41, 836-840.
- ROUSER G., NELSON G.J., FLEISCHER S. et SIMON G., 1968 - Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs in "Biological membranes", CHAPMAN D. ed., Academic Press, Londres, p. 5-69.
- ROUSLIN W. et SCHATZ G., 1969 - Interdependence between promitochondrial and cytoplasmic protein synthesis during respiratory adaptation in Baker's yeast, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37, 1002-1007.
- RUIS H., 1971 - Isolation and characterization of peroxysomes from potato tubers *Hoppe Seyler's Physiol. Chem.*, 352, 1105-1112.

- RUTHERFORD P.P., 1971 - Inhibition by actinomycin D of water uptake and invertase and hydrolase activities induced in Jerusalem artichoke tuber tissue disks by treatment with 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, *Phytochemistry*, 10, 1469-1472.
- SABATINI D.D., TASHIRO Y. et PALADE G.E., 1966 - On the attachment of ribosomes to microsomal membranes, *J. Mol. Biol.*, 19, 503-524.
- SAKANO K., ASAHI T. et URITANI T., 1968 - Heterogeneity of mitochondrial particles in fresh and wounded tissue of sweet potato roots, *Plant Cell Physiol.*, 9, 49-60.
- SAKANO K. et ASAHI T., 1969 - Activation of protein synthesis and biogenesis of mitochondrial particles during aging of disks of sweet potato root tissue, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1433-1445.
- SAKANO K. et ASAHI T., 1971a - Biochemical studies on biogenesis of mitochondria in wounded sweet potato mitochondria. I- Time course analysis of increase in mitochondrial enzymes, *Plant Cell Physiol.*, 12, 417-426.
- SAKANO K. et ASAHI T., 1971b - Biochemical studies on biogenesis of mitochondria in wounded sweet potato root tissue. II- Active synthesis of membrane-bound protein of mitochondria, *Plant Cell Physiol.*, 12, 427-436.
- SAMPSON M.J. et LATIES G.G., 1968 - Ribosomal RNA synthesis in newly sliced disks of potato tuber, *Plant Physiol.*, 43, 1011-1016.
- SAUNER M.T. et LEVY M., 1971 - Study of the transfer of phospholipids from the endoplasmic reticulum to the outer and inner mitochondrial membranes, *J. Lipid Res.*, 12, 71-75.
- SCHATZ G., 1970 - Biogenesis of mitochondria in "Membranes of mitochondria and chloroplasts", RACKER E., ed., Van Nostrand, Reinhold, New-York, p. 252-314.
- SCHEPHARD E H. et HUBSCHER G., 1969 - Phosphatidate biosynthesis in mitochondrial subfraction of rat liver, *Biochem. J.*, 113, 429-440.
- SCHLENDER K.K., BELL H.M. et BUKOVAC M.J., 1969 - Uptake and metabolism of ^{14}C chloramphenicol by A. coleoptiles, *Phytochemistry*, 8, 957-962.
- SCHNEIDER W.C., 1963 - Intracellular distribution of enzymes XIII Enzymatic synthesis of deoxycytidine diphosphate choline and lecithin in rat liver, *J. Biol. Chem.*, 238, 3572-3578.
- SCHULTZ J. et LYNEN F., 1971 - Untersuchungen zur Biosynthese ungesättigter Fettsäuren in Hefe, *European J. Biochem.*, 21, 48-54.
- SE YONG LEE, KRSMANOVIC V.K. et BRAWERMAN G., 1971 - Attachment of ribosomes to membranes during polysome formation in mouse sarcoma 180 cells, *J. Cell Biol.*, 49, 683-691.
- SHAW W. et MANOCHA M.S., 1965 - Fine structure in detached senescing wheat leaves, *Canad. J. Botany*, 43, 747-756.
- SHIBUYA I., HONDA H. et MARUO B., 1967 - A simplified colorimetry without incineration of phosphorus in phosphatides, *Agr. Biol. Chem.*, 31, 111-114.
- SIEKEVITZ P., 1963 - Protoplasm : endoplasmic reticulum and microsomes and their properties, *Ann. Rev. Physiol.*, 25, 15-40.
- SIEKEVITZ P. et PALADE G.E., 1960 - A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig V. *In vivo* incorporation of leucine- ^{14}C into the chymotrypsinogen of various cell fractions, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7, 619-630.
- SIMON E.J. et SHEMIN D., 1953 - The preparation of S-Succinyl coenzyme A, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 2520-2522.
- SO A.G. et DAULE E.W., 1963 - The incorporation of aminoacids into protein in a cell free system from yeast, *Biochem.*, 2, 132-136.

- SOTTOCASA G.L., ERNSTER L., KUYLENSTIERNA B. et BERGSTRAND A., 1967 - Occurrence of an NADH-cytochrome c reductase system in the outer membrane of rat liver mitochondria "in *Mitochondrial Structure and compartmentation*", QUAGLIARIELLO E., PAPA S., SLATER E.C. and TAGER J.M., ed., Bari, Adriatica, p. 74-89.
- SPERLING E. et LATIES G.G., 1963 - The dependence of auxin-induced growth on auxin dependent metabolic changes in slices of storage tissue, *Plant Physiol.*, 38, 546-550.
- SRIVASTAVA B.I.S. et ARGLEBE C., 1967 - Studies on ribosomes from barley leaves. Changes during senescence, *Plant Physiol.*, 42, 1497-1503.
- STEIN O. et STEIN Y., 1967 - Lipid synthesis, intracellular transport and storage III. Electron microscopic radioautographic study of the rat heart perfused with tritiated oleic acid, *J. Cell Biol.*, 36, 63-78.
- STEIN O. et STEIN Y., 1969 - Lecithin synthesis, intracellular transport and secretion in rat liver. IV- A radioautographic and biochemical study of choline deficient rats injected with choline ³H, *J. Cell Biol.*, 40, 461-483.
- STEWART F.C., 1930 - Diffusion of certain solutes through membranes of living plant cells and its bearing upon certain problems of solute movement in the plant, *Protoplasma*, 11, 521-527.
- STEWART F.C., 1932 - The absorption and accumulation of solutes by living plant cells. II- A technique for the study of respiration and salt absorption in storage tissue under controlled environmental conditions, *Protoplasma*, 15, 497-516.
- STEWART F.C., WRIGHT R. et BERRY W.E., 1932.- The absorption and accumulation of solutes by living plant cells. III- The respiration of cut disks of potato tuber in air and immersed in water, with observations upon surface : volume effects and salt accumulation, *Protoplasma*, 16, 576-611.
- STEWART F.C. et PRESTON C., 1940 - Metabolic processes of potato disks under conditions conducive to salt accumulation, *Plant Physiol.*, 15, 23-61.
- STEWART F.C., BERRY W.E., PRESTON C. et RAMAMURTI T.K., 1943 - The accumulation and absorption of solutes by living plant cells. X- Time and temperature effect on salt uptake by potato disks and the influence of the storage conditions of the tubers on metabolism and other properties, *Ann. Botany*, 7, 221-260.
- STICH C., 1891 - Die athmung der pflanzen bei verminderter sauerstoffspannung und bei verletzungen, *Flora*, 74, 1-57.
- STILES W. et DENT K.W., 1947 - Researches on plant respiration. VI- The respiration in air and in nitrogen of thin slices of storage tissues, *Annals of Botany*, 1-34.
- STOFFEL W. et SCHIEFER H.G., 1968 - Biosynthesis and composition of phosphatides of outer and inner mitochondrial membranes, *Hoppe Seyler's Physiol. Chem.*, 349, 1017-1026.
- STUBBE W., 1971 - Origin and continuity of plastids in "Origin and continuity of cell organelles" ed., REINERT J. and URSprung H., Springer Verlag, Heidelberg New York, p. 65-81.
- STUMPF P.K., 1970 - Fatty acid metabolism in plants in "Lipid metabolism", WAKIL S.J., ed., Academic Press, New York, p. 79-106.
- SUMIDA S. et MUDD J.B., 1968 - Biosynthesis of cytidine diphosphate diglyceride by cauliflower mitochondria, *Plant Physiol.*, 43, 1162-1164.
- TARLOV A., 1968 - Turnover of mitochondrial phospholipids by exchange with soluble lipoproteins *in vitro*, *Fed. Proc.*, 27, p. 458.
- TEPPERMAN H.M. et TEPPERMAN J., 1958 - The hexose monophosphate shunt and adaptation to hyperlipogenesis, *Diabetes*, 7, 478-485.
- THIBAUDIN A., 1970 - La lipogénèse dans les "microsomes" du parenchyme de Pomme (*Pirus malus* L.), Thèse Doctorat 3ème Cycle, Faculté des Sciences de Paris, 90 pp.

- THIMAN K.V. et LOOS G.M., 1957 - Protein synthesis during water uptake by tuber tissue, *Plant Physiol.*, 2, 274-279.
- THOMPSON J.F. et MORRISON G.R., 1951 - Determination of organic nitrogen, *Anal. Chem.*, 23, 1153-1157.
- TREMOLIERES A., 1972 - Biosynthèse de l'acide linoléique dans la feuille de Pois, *Phytochemistry*, sous presse.
- TREMOLIERES A. et LEPAGE M., 1971 - Changes in lipid composition during greening of etiolated Pea seedlings, *Plant Physiol.*, 47, 329-334.
- TUAN D.Y.H. et BONNER J., 1964 - Dormancy associated with repression of genetic activity, *Plant Physiol.*, 39, 768-772.
- TUPPY H. et BIRKMAYER C.D., 1969 - Cytochrome oxidase apoprotein in "Petite" mutant yeast mitochondria. Reconstitution of cytochrome oxidase by combining apoprotein with cytohematin, *European J. Biochem.*, 8, 237-243.
- ULRICH R., 1936 - *Réactions des fruits aux blessures expérimentales*, Thèse Doctorat d'Etat, Sorbonne, Lesot ed., 190 pp.
- URITANI I. et YAMAKI S., 1969 - Mechanism of chilling injury in sweet potatoes. III- Biochemical mechanism of chilling injury with special reference to mitochondrial lipid components, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 480-487.
- VAN STEVENINCK R.F.M. et JACKMAN M.E., 1967 - Respiratory activity and morphology of mitochondria isolated from whole and sliced storage tissue, *Austr. J. Biol. Sci.*, 20, 749-761.
- VAN STEVENINCK R.F.M., et VAN STEVENINCK M.E., 1969 - Formation of new mitochondria in plant cells, *Naturwissenschaften*, 56, p. 146.
- VASQUEZ D., 1966 - Mode of action of chloramphenicol and related antibiotics, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 16, 169-191.
- VASQUEZ D. et MONRO R.E., 1967 - Effects of some inhibitors of protein synthesis on the binding of aminoacyl tRNA to ribosomal subunits, *Biochim. Biophys. Acta*, 142, 155-173.
- VAUGHAN D. et Mac DONALD I.R., 1967 - The effect of inhibitors on the increase in invertase activity and RNA content of beet disks during ageing, *J. Exp. Bot.*, 18, 587-593.
- VERLEUR J.D., 1965 - Studies on the isolation of mitochondria from potato tuber tissues, *Plant Physiol.*, 40, 1003-1007.
- VERLEUR J.D., 1969 - Observations on the induction of mitochondrial particles in potato tuber tissue after wounding, *Z. Pflanzen Physiol.*, 61, 299-309.
- VERLEUR J.D. et URITANI I., 1965 - Respiratory activity of the mitochondrial fractions isolated from healthy potato tubers and from tuber tissue incubated after cutting or infection with *Ceratocystis fimbriata*, *Plant Physiol.*, 29, 369-771.
- VIJAY I.K. et STUMPF P.K., 1971 - Fat metabolism in higher plants. XLVI- Nature of the substrate and the product of oleyl Coenzyme A desaturase from *Carthamus tinctorius*, *J. Biochem.*, 246, 2910-2917.
- VIJAY I.K. et STUMPF P.K., 1972 - Fat metabolism in higher plants. XLVII- Properties of oleyl-coenzyme A desaturase of *Carthamus tinctorius*, *J. Biol. Chem.*, 247, 360-372.
- VORBECK M.L. et MARINETTI G.V., 1965 - Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography, *J. Lipid. Res.*, 6, 3-6.
- WAKIL S.J., 1970 - Fatty acid metabolism in "Lipid metabolism", WAKIL S.J. ed., Acad. Press, New York et Londres, p. 1-48.

- WARD T. et WARD E., 1968 - The multiplication of golgi bodies in the oocytes of *Rana pipiens*, *J. Microscop.*, 7, 1007-1020.
- WARNER J.R., KNOFF P.M. et RICH A., 1963 - A multiple ribosomal structure in protein synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 49, 122-129.
- WARNER J.R., RICH A. et HALL C.E., 1962 - Electron microscopic studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin, *Science*, 138, 1399-1403.
- WATERS L.C. et DURE III L.S., 1966 - Ribonucleic acid in germinating cotton seeds, *J. Mol. Biol.*, 19, 1-27.
- WATSON J.D., 1963 - Involvement of RNA in the synthesis of proteins, *Science*, 140, 17-46.
- WEEKS G., SHAPIRO M., BURNS R.O. et WAKIL S.J., 1969 - Control of fatty acid metabolism. I- Induction of the enzymes of fatty acid oxidation in *Escherichia coli*, *J. Bact.*, 97, 827-836.
- WEEKS G. et WAKIL S.J., 1970 - Studies on the control of fatty acid metabolism. II- The inhibition of fatty acid synthesis of *Lactobacillus plantarum* by exogenous fatty acids, *J. Biol. Chem.*, 245, 1913-2017.
- WELLS R.D., 1969 - Actinomycin binding to DNA : inability of a DNA containing guanine to bind actinomycin D, *Science*, 165, 75-76.
- WEN JING TANG et CASTELFRANCO P.A., 1968 - Phospholipid synthesis in aging potato tuber tissue, *Plant Physiol.*, 43, 1232-1238.
- WHALEY W.G., MOLLENHAUER H.H. et LEECH J.H., 1960 - The ultrastructure of the meristematic cell, *Am. J. Botany*, 47, 401-450.
- WHALEY W.G., KEPHART J.E. et MOLLENHAUER H.H., 1964 - The dynamics of cytoplasmic membranes during development in "*Cellular membranes in development*", Locke M. ed., Academic Press, New-York et Londres, p. 135-173.
- WHALEY W.G., DAUWALDER M. et KEPHART J.E., 1971 - Assembly, continuity and exchange in certain cytoplasmic membrane systems in "*Origin and Continuity of cell organelles*", Reinert J. et Ursprung H. ed., Springer-Verlag Pub., Berlin p. 1-45.
- WHEREAT A.F., HULL F.E., ORISHIMO M.W. et RABINOWITZ J.L., 1967 - The role of succinate in the regulation of fatty acid synthesis by heart mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 242, 4013-4022.
- WILGRAM G.F. et KENNEDY E.P., 1963 - Intracellular distribution of some enzymes catalyzing reactions in the biosynthesis of complex lipids, *J. Biol. Chem.* 238, 2615-2619.
- WILLEMOT C. et STUMPF P.K., 1967a - Fat metabolism in higher plants. XXXIII- Development of fatty acid synthetase during the "aging" of storage tissue slices, *Canad. J. Botany*, 45, 579-584.
- WILLEMOT C. et STUMPF P.K., 1967b - Fat metabolism in higher plants. XXXIV- Development of fatty acid synthetase as a function of protein synthesis in a aging potato tuber slices, *Plant Physiol.*, 42, 391-397.
- WILSON R.H. et HANSON J.B., 1969 - The effect of respiratory inhibitors on NADH, succinate and malate oxidation in corn mitochondria, *Plant Physiol.*, 44, 1335-1341.
- WIRTZ K.W.A. et ZILVERSMIT D.B., 1968 - Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, 243, 3596-3602.
- WIRTZ K.W.A. et ZILVERSMIT D.B., 1969a - Participation of soluble liver proteins in the exchange of membrane phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta*, 193, 105-116.

- WIRTZ K.W.A. et ZILVERSMIT D.B., 1969b - The use of phenobarbital and carbon tetrachloride to examine liver phospholipid exchange in intact rat, *Biochim. Biophys. Acta*, 187, 468-476.
- WIRTZ K.W.A., VAN GOLDE L.M.G. et VAN DEENEN L.L.M., 1970 - The exchange of molecular species of phosphatidylcholine between mitochondria and microsomes of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 176-178.
- WIRTZ K.W.A. et ZILVERSMIT D.B., 1970 - Partial purification of phospholipid exchange protein from beef heart, *FEBS Letters*, 7, 44-46.
- WOJTCZAK L. et WOJTCZAK A.B., 1960 - Uncoupling of oxidative phosphorylation and inhibition of ATP-Pi exchange by a substance from insect mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 277-286.
- WOJTCZAK L., BOGUCKA K., SARZALA M.G. et ZALUSKA H., 1969 - Effect of fatty acids on energy metabolism and the transport of adenine nucleotides in mitochondria and other cellular structures, *FEBS Symposium*, 17, 79-92.
- WOJTCZAK L., BARANSKA D., ZBOROWSKI J. et DRAHOTA Z., 1971 - Exchange of phospholipids between microsomes and mitochondrial outer and inner membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 249, 41-52.
- YANG S.F. et STUMPF P.K., 1965 - Fat metabolism in higher plants. XXI- Biosynthesis of fatty acids by avocado mesocarp enzyme systems, *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 19-26.
- YARMOLINSKY M. et DE LA HABA G., 1959 - Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 45, 1721-1729.
- ZBOROWSKI J. et WOJTCZAK L., 1969 - Phospholipid synthesis in rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 187, 73-84.
- ZILVERSMIT D.B., 1971a - Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and artificially prepared phospholipid aggregates by a soluble fraction from liver, *J. Biol. Chem.*, 246, 2645-2649.
- ZILVERSMIT D.B., 1971b - Exchange of phospholipid classes between liver microsomes and plasma : comparison of rat, rabbit and guinea pig, *J. Lipid Res.*, 12, 36-42.

UNIVERSITÉ DE PARIS VI

4, Place Jussieu - 75230 PARIS-CEDEX 05

SERVICE DE LA SCOLARITE

Bureau des Enseignements du 3^e cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - 325-12-21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : DOCTORAT ES SCIENCES

THESE DE : SCIENCES NATURELLES

NOM : Monsieur BEN ABDELKADER

Prénoms : Ahmed

né le 31 mars 1941 à SOUSSE Dép^t : TUNISIE

1^{ère} THESE : "Biogénèse de lipides membranaires pendant la survie de tranches de tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

2^e THESE (Propositions faites par l'Université) :

PRESIDENT : M. ULRICH

EXAMINATEURS : M. DUCET
M. MAZLIAK
M. LIORET

Vu et Approuvé

PARIS, le 9 janvier 1973

Le Président

de l'Université de PARIS VI

